

# 修 士 学 位 論 文

題 名

肝細胞移植のためのディーン流れと  
液液二層流を用いた細胞選別法に関する研究

指導教員      小原   弘道      准教授

2019   年   1   月   10   日      提出

首都大学東京大学院

理工学研究科      機械工学   専攻

学修番号   17883335

氏   名   森川   朋樹

## 学位論文要旨（修士（工学））

論文著者名 森川 朋樹

論文題名：肝細胞移植のためのディーン流れと液液二層流を用いた  
細胞選別法に関する研究

### 本文

肝臓は人体の体内における最大の臓器であり、三大栄養の代謝やエネルギーの貯蔵を行う生命維持に不可欠な臓器である。この肝臓の疾患への手法として肝臓移植があげられるが、ドナー肝臓の供給不足の問題も有している。これに代わる手法として肝臓をコラゲナーゼ灌流により分離して得た肝実質細胞をカテーテルにより肝臓に移植し、機能改善を図る肝細胞移植が挙げられる。この肝細胞移植は肝臓移植と比較して開腹が無く低リスクであることなどから特に先天代謝異常症などの新生児への治療法として注目されている技術である。しかしながら肝細胞を得るための供給源が不足していることや、凍結保存・解凍のプロセスにおける障害の可能性、移植した肝細胞の肝臓表皮への生着率が低く、肝機能の改善のために長期間にわたる複数回の移植が必要であることなどの未解決の課題を多く有する技術である。また肝細胞の特性として、力学的影響や生化学的影響により死滅してしまいやすい脆弱性を有すること、細胞一つの単離細胞と比較して細胞がいくつか凝集した細胞塊が安全性や活性に優れることが明らかとなっている。そこで課題解決のために細胞に低侵襲な状況下における高機能を有する生細胞塊の選別技術が求められる。この選別技術の開発のために脾臓保存に用いられる二層法とディーン流れを用いた選別法の二種類を同時に用いた選別法が提案されている。二層法とは高密度流体と低密度流体によって形成される液液界面上に臓器・細胞を浮遊させ、力学的負荷を低減する技術であり、ディーン流れによる粒子選別法とは曲り管の二次流れである上下一対の流れ中の流体抗力と揚力により粒子を特定の場所に集中させる粒子分離法である。本手法では高密度流体として細胞毒性の無いフッ素不活性流体を用いているが、密度差が大きい場合の管内液液界面形成条件について明らかになっていない。そこで本研究では液液二層流とディーン流れを用いた細胞に低侵襲な細胞選別法確立のために、曲り円管内における液液二層流の形成条件の解明、細胞を模擬した粒子を用いて高機能細胞選別の最適条件の検討を目的とし、実験・数値流体解析を行った。

本研究では内径の異なるガラス管にシリンジポンプを用いて密度の異なる 2 流体を同時に同量送液し、流量・管内径・供試流体について変化させる実験、実

験と同様のモデルにおいて様々な物性値における数値流体解析を行った。形成した界面形状を二層流状の水平界面と液滴状の界面に分類し、レイノルズ数、ウェーバー数、キャピラリー数、エトベス数等の無次元数での評価を行うことで液液二層流形成条件の検討を行い、2液の界面張力に比べて慣性力や粘性力、重力による影響が支配的である場合に液液二層流が形成することを示し、細胞選別が求められるスケールにおいて内径が 1mm, 6mm の時により広い範囲において液液二層流の形成が可能であることを示した。

また本研究では単離細胞、細胞塊と同様の粒径・密度を有した粒子を低密度流体である精製水に分散し作成した粒子研濁液と高密度流体であるフッ素不活性流体を用いて液液二層流を形成し、観察区間である曲り管終端部においてレーザーによる励起、高速度カメラ等による直上からの観察を行うことで界面上の粒子分布を観察、評価を行った。粒子分布と解析による検討から 6mm 管においてディーン流れによる流体抗力と重力の釣り合いにより流路外側に粒子が偏在する条件が存在し、この条件が粒子の密度、粒径により異なることを示した。また 1mm 管において揚力の大小により、粒径による選別の可能性を示した。

本論文は全 5 章からなる。

第 1 章は緒論であり、肝細胞移植の位置づけや利点・課題について、課題と現状、選別法の構成要素である液液二層流とディーン流れによる粒子分離法の現在までの研究について記述する。

第 2 章では、評価に用いた無次元数や数値流体解析に用いた解析手法・支配方程式、細胞を模擬した粒子の選別理論について記述する。

第 3 章では、液液界面形成実験、細胞模擬粒子選別実験に用いた装置の詳細、実験条件・手順、解析条件・評価方法について記述する。

第 4 章では、実験・数値流体解析によって形成した界面の形状をいくつかの無次元数で整理・考察を行い、円管内において 2 液の界面張力と比較して、慣性力・粘性力・重力の影響が大きい場合において円管内の液液二層流の形成が可能であることを示した。また同様に直管だけでなく曲り管においても同様の検討を行い、曲り円管内における液液二層流の形成条件への拡張を行った。次に生単離細胞・生細胞塊スケールの細胞模擬粒子を用いて曲り管内二層流中の粒子分布を示し、数値流体解析による粒子追跡結果や、粒子に加わる力の計算結果と比較することで、6mm 管など比較的大きいスケールにおいて、縦方向の流体抗力と重力の大小による粒子選別の理論、1mm 管等の粒子の数百倍スケールの管における流体の速度勾配による揚力と外側への流体抗力、遠心力等の水平方向への力の大小による粒子径での選別理論を示し、細胞選別への最適条件の検討を行った。

第 5 章では、本研究で得られた成果を総括し、今後の展開と課題、その解決法について記述する。

# 目次

## 一章 緒言

1.1. 肝細胞移植 .....	2
1.2. 課題と開発ニーズ .....	4
1.3. 液液二層流 .....	5
1.4. ディーン流れによる粒子選別法 .....	8
1.5. 目的 .....	11

## 二章 理論

2.1. 無次元数の定義 .....	13
2.2. 数値解析手法 .....	14
2.3. 管内粒子の受ける力 .....	16
2.4. 細胞分離理論 .....	19

## 三章 実験方法

3.1. 実験装置概要 .....	24
3.2. 送液系 .....	25
3.3. 観察系 .....	26
3.4. 使用流体 .....	27
3.5. 使用粒子 .....	29
3.6. 数値流体解析概要 .....	30
3.7. 界面形成実験 .....	34
3.7.1. 管径変化実験 .....	36
3.7.2. 供試流体変化実験 .....	36
3.8. 数値流体解析による界面形成 .....	37

3.9. 曲り管内液液界面形成実験・解析 .....	39
3.9.1. 曲り管内界面形成実験 .....	39
3.9.2. 曲り管内液液二層流様相のための数値流体解析 .....	39
3.10. 粒子分離実験 .....	40
3.10.1. 密度差粒子選別実験 .....	45
3.10.2. 粒径差粒子選別実験 .....	45
3.10.3. 管径変化による粒子選別特性変化 .....	45
3.11. 数値流体解析・数値計算による流体挙動・粒子追跡 .....	46
3.11.1. 数値解析による管受流体挙動見積もり .....	46
3.11.2. 数値解析による粒子追跡 .....	48

#### 四章 結果考察

4.1 界面形成実験 .....	51
4.1.1 管径変化実験 .....	54
4.1.2 供試流体変化実験 .....	57
4.1.3 数値流体解析 .....	62
4.1.4 流体の密度差による水平界面形成 .....	65
4.2 曲り管内界面形成結果 .....	65
4.2.1 曲り管内液液界面形成実験 .....	65
4.2.2 数値流体解析における曲がり管内液液界面形成 .....	66
4.2.3 数値流体解析による形成界面の定性評価 .....	68
4.3 細胞模擬粒子実験結果 .....	71
4.3.1 密度差粒子選別実験結果 .....	71
4.3.2 粒径差粒子選別実験結果 .....	77
4.3.3 管径変化における粒子選別特性変化 .....	83

4.3.4	数値流体解析における管内流体・粒子挙動 .....	88
4.3.5	デーン流れ流速と粒子に加わる力の検討 .....	107
4.3.6	最適選別条件の検討.....	115
五章 結論.....		121
謝辞.....		123
参考文献 .....		124

# 一章 緒論

## 1.1 肝細胞移植

肝臓は人体の右上腹部に位置し体重の 1/50~1/45 を占める体内では最大の臓器である。この肝臓には糖質，脂質，蛋白質の三大栄養素の代謝について過剰なものの貯蔵および不足物の供給や合成を行いエネルギーの貯蔵等を行う役割があり，中間代謝としての重要な働きをしている。また小腸での脂肪の消化吸收の補助を行う非常に重要な液体である胆汁の合成や分泌，加えて薬物の代謝や解毒など全身の内部環境維持に重要な役割を多く担っており，生命維持に不可欠な臓器である。<sup>[1]</sup>この肝臓の特性として再生能力が高く，通常の肝機能を有する人であれば最大全肝の 7 割程度までは切除後，もとの大きさに再生する。

このように肝臓の機能は多岐にわたるため，人工心臓や人工透析装置のような人工肝臓の開発には課題が多く，臨床可能な大規模装置は存在しない現状が存在する。そこで現在重大な肝疾患に対する手法として肝臓移植が広く用いられている。肝臓移植は健常者の肝臓の一部をレシピエントに移植する生体肝移植と脳死患者の肝臓を移植する脳死肝移植の 2 種類が存在する。肝臓移植は重大な肝疾患を患うレシピエントに必要とされ，国内では日本臓器移植ネットワークでの肝臓移植希望登録者のうち約 98 パーセントが予想余命 1 年以内と推測されているが，待機期間が 1 年未満の登録者は全体の約 26 パーセントと低く，ドナー肝臓の需要に対して脳死ドナーの肝臓供給が間に合っていない現状が存在する。<sup>[2]</sup>このことから日本において生体肝移植と脳死肝移植の割合は約 9:1 と生体肝移植が高い割合を示している。<sup>[3]</sup>しかしこの生体肝移植にも健常者に対して開腹を行うリスクや手技が求められるという倫理的問題が存在する。これらのドナー不足の問題は国内のみならず世界的に深刻な問題である。

一方で正常な細胞を患者の結果に注入，目的箇所に生着させることでサイトカイ



ンや増殖因子などの液性因子を周囲の細胞に供給することで治療効果を促すものや、本来の機能を発現させ疾患細胞の代替をさせる細胞移植も注目を集めている。近年では白血病に対する造血幹細胞移植<sup>[4]</sup>や膵臓疾患に対する膵島移植<sup>[5]</sup>が代表であり、実際に用いられている。肝機能に対する細胞移植としても、肝臓移植と同じく肝臓の機能代替を目的とした肝細胞移植<sup>[6]</sup>が存在する。本研究の対象である肝細胞移植は、肝実質細胞（以下肝細胞と示す）を機能の一部が欠損した肝臓内に輸注し、正常な肝細胞を肝臓内に生着させることで案もない代謝能などの欠損した肝機能を補間する治療法である。<sup>[6-7]</sup>肝細胞移植の利点として、肝臓移植と異なり開腹の必要がないため、外科的侵襲が少なく患者へのリスクも少ないことがあげられ、積極的に臨床研究が進められている。特に 100 例の肝疾患への実験的治療が 2014 年までに行われており、肝細胞移植が代謝性疾患に対して疾患の特徴的な症状の改善や逆転が容易に定量化できることが明らかになっている。<sup>[7]</sup>しかし肝細胞移植のみでは多くの時間を要するため、代謝性疾患を完治した例はないのが現状である。これらのことから肝細胞移植は、肝臓移植を行うことのできない先天代謝異常症の新生児に対しての治療法<sup>[6]</sup>として注目されており、小児患者に対し肝臓移植が可能になるまで成長を促すといった橋渡し医療としての役割で手術が困難であり肝臓移植を行うことができない新生児を対象とした治療方法として注目を集めている。日本においても国立成育医療研究センターで国内初の肝細胞移植の臨床研究が先天代謝異常症の新生児を対象に行われるなど積極的な研究が進められている。<sup>[8]</sup>また肝細胞移植は万能細胞と呼ばれる iPS・ES 細胞由来の細胞移植への展開などの点についても注目を集めており、国立成育医療研究センターでも ES 細胞由来の肝細胞移植が取り組まれている。

## 1.2 課題と開発ニーズ

移植に用いられる肝細胞は供給源である脂肪肝などの移植不適合肝や心停止ドナーからの提供、部分肝移植の際に生じた余剰肝組織を灌流液により脱血したのち、酵素であるコラゲナーゼ溶液を用いて灌流することで肝臓を肝細胞に分離し、メッシュを通すことで大きな細胞塊を除いて得られる。<sup>[9]</sup>得られた肝細胞を凍結保存することにより、使用したい時に解凍して用いることが出来ることも利点の一つである。しかしながらこの凍結処理において肝臓の部位によっては代謝能や生細胞率が低下する<sup>[10]</sup>など、肝細胞移植は多くの課題をいまだ有している。特に大きな課題として細胞数確保の必要と肝細胞の機能維持が挙げられる。細胞数確保は細胞の供給源が前にあげたもののみであり十分でない<sup>[9]</sup>ことによるものであり、臨床研修としての普及を阻む主な問題である。また肝細胞の機能維持について、肝細胞は非常に弱く虚弱性<sup>[11-12]</sup>を有する細胞であり、液性などの生化学的な影響や力学的な負荷によって生細胞数が大幅に減少することが知られている。細胞確保プロセスの過程である細胞分離や凍結保存、解凍においても未解決の障害がいくつも存在する。これらの課題により実際に投与した細胞の生着率は拒絶反応や注入に伴うストレスや自然免疫反応により全投与細胞数の約 10–20 パーセントであり、この割合を向上することが求められている。この生着率向上のため移植前段階での生細胞率の向上が求められる。また肝細胞 1 つの単離細胞よりも 2~5 個程度の細胞塊の方が肝機能活性や安全性の面で優れていることが報告されており、移植に適した細胞塊の大きさが存在することが明らかになっている。<sup>[13]</sup>これらのことから肝細胞移植に適したサイズの生細胞を十分量、細胞に対して低負荷な状況下で選別する技術が必要である。

### 1.3 液液二層流

これまで考案されてきた分離法はほとんどが粒子と一種類の流体による混相流つまり粒子懸濁液のみを分離デバイスとしていた．しかしながら本研究で対象としている肝細胞は細胞密度  $1200\text{kg}/\text{m}^3$  程度と培地などの流体密度に対して大きく，水平流路において細胞懸濁液のみでは細胞が流路内に沈殿し選別不可になることに加え壁面との摩擦が生じることにより細胞が大きなダメージを受けることが問題となる．そこで臓器保存の臨床研究などで使用されているフッ素不活性液体（フロリナート）を用いた二層法<sup>[14-15]</sup>を利用する．二層法とは Fig.1 に示すような細胞に対して密度の大きな流体を培養液と併せて利用し，流路内で液液界面を形成することで，その界面上に細胞や臓器を浮遊させ安全に保存する方法である．この二層法を利用し水平管内において液液二層流を形成することで細胞への負荷が少ない状況下での運搬が可能である．ここで使用されるフッ素不活性液体は精製水の 20～25 倍の酸素溶解能や容易な酸素放出機能をもつため，臓器の酸素化による温阻血障害の軽減が可能となる高密度流体である．またフッ素不活性液体は生理食塩水や培地などの流体に対し不混合で臓器保存液や人工血液材料として注目されていることに加え，細胞に無害であり臨床研究に利用可能である．しかしこの二層法は臓器保存などにおいて静置条件において用いられている方法であることから，高機能細胞を選別するための流路内で用いるためには安定した液液界面を持つ二層流の形成する必要がある，この条件について調査する必要がある．

液液二層流は一般的にマイクロリアクターなどにおける熱や質量輸送や流体分離に用いられている技術であり，水と灯油の二層流状態における熱・質量輸送の値や，流体分離が管内滞在時間と拡散係数の比の関係などが示されている<sup>[16-17]</sup>．一方液液二層流の界面の形状やその条件についても研究が進められており，テイラーレイラー不安定性による液胞の発生や安定性<sup>[18]</sup>，高レイノルズ数の場合での速度揺ら

ぎとレイノルズ応力により界面に液胞が生じること<sup>[19]</sup>等が明らかである。

液液二層流が属する液液二相流の研究としては二層流と比較してドロップレットやスラグ流の研究が多く盛んに行われている。特に T 字合流部にて形成される液滴の形成条件や流れの様相などについて、慣性力と界面張力の比であるウェーバー数  $We$  数、粘性力と界面張力の比であるキャピラリー数  $Ca$  数を用いて整理できること<sup>[20]</sup>が示されており、また液滴の径は界面張力とせん断速度・水相の粘度によって制御できること<sup>[21]</sup>も示されている。加えて鉛直方向への液滴の上昇について解析的な研究においても、界面張力と密度差の大きさによって上昇速度や液滴形状が異なること<sup>[22-23]</sup>が示されている。同様に管内スラグ流についてはスラグの長さや管の濡れ性が大きく関わり、濡れ性が低い時に小さな  $Ca$  数でせん断流に変化することが報告されている<sup>[24]</sup>。中でも二層流の形成条件により近い研究として、液柱の形成などの安定した界面の形成条件についての研究は液滴から液柱への遷移現象やその条件などが深く研究されている。代表なものとして Fig.1-2 に示すように水相の  $Ca$  数と有機相の  $We$  数によって流れパターンが示されていることが示されている。<sup>[25-26]</sup>実際に液液二層流の形成についても実験が行われており、液柱の形成同様  $We$  数と  $Ca$  数によって流れパターンが示されていることに加え、 $We$  数と拡散相の量の関係にも大きな関係があることを示している<sup>[27-28]</sup>。また  $Oh$  数を複合した  $We$  数などを用いてより詳細な流れパターンについての分類<sup>[29]</sup>や、パイプの材質や合流部の角度によって生じる流れパターンの変化等も報告されている<sup>[30-31]</sup>。しかしながらこれらの液液二層流の研究は水と油やグリセリンなど比較的流体の密度が近いものについての研究であり、本研究で高密度流体として使用しているフッ素不活性流体と培地のように二液の密度差が大きいものについて、これらの研究との相似点、

相違点の検討が必要である.

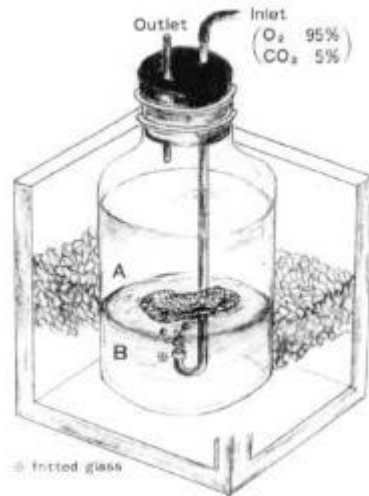


Fig.1- 1 Two layer methods <sup>[14]</sup>

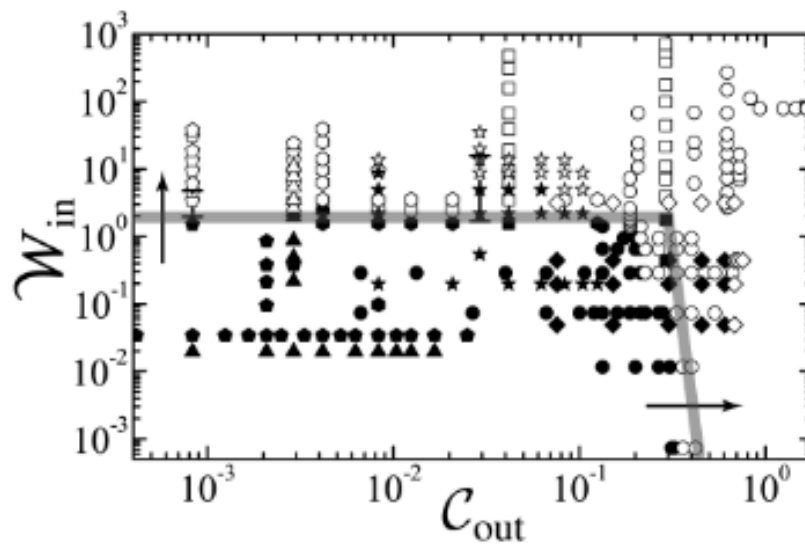


Fig.1- 2 Changing aspects of flow that droplet to jet flow <sup>[26]</sup>

#### 1.4 ディーン流れによる粒子選別法

本研究において前述のような肝細胞移植に適した移植至適細胞の選別を考える．そこで細胞塊を1つの大きな粒子とみなし粒子径の大きさや密度の差異を利用し目的の粒子の分離を行う．分離方法について重力や遠心力，静電気や流体抗力などを利用した様々な粒子分級方法<sup>[32-34]</sup>が存在するが，肝細胞の表面（細胞膜）が長時間破れると死細胞化し機能を失うなど肝実質細胞の力学的負荷に弱い特徴<sup>[11-12]</sup>から低負荷な方法を選択する必要がある．また移植に使用する細胞は  $1 \sim 7.5 \times 10^9$  個と多量であるため<sup>[6]</sup>短時間に大量の細胞を分離選別可能な方法が求められる．

過去の様々な研究の中で，曲がり流路の管内に形成される二次流れであるディーン流れ<sup>[35]</sup>を積極的に利用した既存の分離法<sup>[36]</sup>が提案されている．この曲がり管流れの二次流れは Fig.2 のような曲率半径  $R$  で断面半径  $r$  の円管内を流体が平均速度  $u$  で流れている場合に生じる流れである．流路が曲率を有するために管内を通過する流体に遠心力が加わるが，壁面近傍を通過する流体速度に比べて中央部を通過する流体速度が比較的速いため，より大きな遠心力が中央部に働く．さらに内外壁の異なる圧力分布によって外壁面から内壁面に向かって働く圧力勾配力が流体に作用する．この二力の大小によって生じる流路中心部では外側へ，壁面近傍では内側に流れるような上下対称な一对の渦（ディーン渦）がディーン流れである．一般的に曲がり管内では，ディーン数が遠心力による流れの不安定性を表す無次元数としてレイノルズ数に代わる関数となり式(1-1)により定義される．

$$\text{De} = \text{Re} \sqrt{\frac{r}{R}} \cdots (1.1)$$

ディーン流れの強さはディーン数に依存することが広く知られており，管内の二次流れ速度について解析的に示された式も報告されている<sup>[37]</sup>が，対象はマイクロチャネル系であり自身が対象とするミリメートルスケールとは管内径の大きさが多き

く異なるため二次流れ速度や二層流時の二次流れ速度についてはよりマクロスケールのディーン流れに数値的な解析など<sup>[38]</sup>を用いて検討を行うことが必要である。

このディーン流れを用いた粒子分離法<sup>[36]</sup>は曲り管内に形成する二次流れのディーン流れによる抗力と管壁面へと向かおうとする揚力の釣り合いにより管内側もしくは外側に適当な粒子を偏在させることにより粒子の分級を行う方法である。この粒子分離法は主に矩形管においてディーン数の大きさや粒子と管径の比などにより粒子分離が可能であることが明らかになっている。また流体と密度が近い細胞に対して実際に実験が行われ分離が可能であることも示されている<sup>[39-40]</sup>。さらに分離の後に分離細胞を液胞でカプセル化させる研究やエレクトロスプレー法による質量分析などに応用されている技術である<sup>[41-42]</sup>。しかしながら本方法は腫瘍細胞の分離<sup>[43-44]</sup>や神経芽細胞や間葉系幹細胞の分離<sup>[45]</sup>などの比較的培養等に向いている力学的刺激に強い細胞に用いられており、肝実質細胞のような虚弱性を有する細胞には用いられていないのが現状である。これらの現象を検証する上で管内における粒子への力が重要であるが、この分野について管内径に対して粒子径が比較的大きい場合に生じる管内主流速度分布による揚力により、粒子が内側及び外側から力を受けることで管内の決まった位置に集まる条件が存在することも報告されている<sup>[46-47]</sup>ため管内粒子へ働く力を検討することも必要である。

このディーン流れによる粒子分離法方法と細胞に低侵襲である液液二層流を同時に用いることで管内において細胞を傷つけることなく分離可能な方法が考えられている。この方法はディーン数がある値を超えた場合に密度の小さい粒子や流径の小さい粒子がディーン流れに乗り流路内部をらせん状に進行し、一方粒径や密度の大きな粒子はディーン流れに乗らず外側壁面近傍に偏在し流路を進行することにより分離が可能であると考えられる。またこの分離方法は本研究の目的である肝細胞だけでなく、低負荷下で密度、粒径において分級を行う手段として睥島やレア

メタルの分級など様々な分野に活用していけるものである。

これまでの研究<sup>[13]</sup>にて液液二層流とディーン流れを用いた粒子分離実験において、曲がり管内を通過した粒子の粒子分布はレイノルズ数ではなくディーン数に依存すること、特定の粒子について粒子が外側に多く偏在するディーン数（臨界ディーン数）が存在することが明らかとなっているが、実際の細胞スケールでの粒子では実証されておらず、検証が必要である。また分離の理論や式についても確立されておらず、実細胞スケールでの利用のため実験・解析による選別理論方法の確立や理論式の推定が必要である。

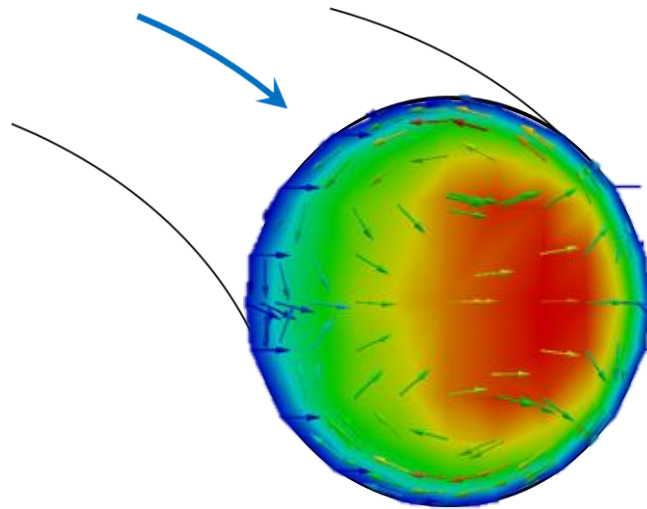


Fig.1- 3 Dean flow <sup>[30]</sup>



## 1.5 目的

そこで本研究では高密度流体としてフッ素不活性液体を用いた場合の管内液液二層流形成条件の解明すること，二層流形成条件内における細胞模擬粒子を用いた粒子選別実験による選別条件の解明および理論式の確立，細胞選別に向けた選別デバイス開発を目的とする．

そのために液液二層流形成実験に関して，直管条件において用いた管の素材・管内径を変化した際の界面形成実験，高密度流体として用いるフッ素不活性液体を変化させ界面形成を観察する供試流体変化実験に加え，実験条件や再現不可能な物性値による界面形成の解析的な検討を行い，二層流を形成した細胞選別に最適である二層流形成の条件の考察を記述する．この直管の安定界面形成条件を曲り管におけるものに拡張し，実験結果と比較する．次に細胞模擬粒子を用いた粒子分離実験に関して，細胞スケールの密度・粒径の粒子を用いて，粒子密度が変化した際の粒子選別条件，粒子径が変化した際の粒子選別条件，および算出した粒子に働く力との比較を示す．これらの比較や解析による粒子の挙動との比較から管内流体の挙動を考察し，粒子選別のための理論式を定義する．

## 二章 理論

## 2.1. 無次元数の定義

本研究に用いた無次元数を記す．また各種文字が示す内容についてここで示す．

レイノルズ数  $Re$

慣性力と粘性力の比

$$Re = \frac{\rho U D}{\mu} \dots (2.1)$$

( $\rho$ : 流体密度[kg/m<sup>3</sup>],  $U$ : 平均流速[m/s],  $D$ : 代表長さ[m],  $\mu$ : 粘度[Pa \* s])

ウェーバー数  $We$

慣性力と界面張力の比

$$We = \frac{\rho U^2 D}{\sigma} \dots (2.2)$$

( $\sigma$ : 界面張力[N/m])

キャピラリー数  $Ca$

粘性力と界面張力の比

$$Ca = \frac{\mu U}{\sigma} \dots (2.3)$$

エトベス数  $Eo$

重力と界面張力の比

$$Eo = \frac{\Delta \rho g D^2}{\sigma} \dots (2.4)$$

( $g$ : 重力加速度[m/s<sup>2</sup>])

ディーン数  $De$

曲り管における不安定さを表す無次元数，ディーン数の強さに依存する

$$De = Re \sqrt{\frac{d}{2R}} \dots (2.5)$$

( $d$ : 管断面直径[m],  $R$ : 曲り管曲率半径[m])

## 2.2. 数値解析手法

本研究において用いた解析手法に用いた支配方程式を示す.

連続の式：非圧縮性流体において流入流出の体積が同一である式

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \cdots (2.6)$$

流体の運動方程式：運動エネルギー保存式

$$\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} = -(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} + \nu \Delta \mathbf{u} - \frac{1}{\rho} \nabla p + \mathbf{f} \cdots (2.7)$$

圧力方程式：定常流において圧力が一定である式

$$\Delta p = \frac{\rho}{\delta t} \nabla \cdot \mathbf{u} \cdots (2.8)$$

界面張力：二流体の界面に垂直に働く界面張力の大きさ

$$\mathbf{F}_\sigma = \sigma \mathbf{k} n \delta_s \cdots (2.9)$$

輸送方程式：体積分率 $\alpha$ に対する流れ上の物理量保存の式

$$\frac{\partial \alpha}{\partial t} + \nabla \cdot (\alpha \mathbf{v}) = 0 \cdots (2.10)$$

体積分率 $\alpha$ に依存する流体の物性値

$$\rho = \alpha \rho_{l1} + (1 - \alpha) \rho_{l2}, \cdots (2.11)$$

$$\mu = \alpha \mu_{l1} + (1 - \alpha) \mu_{l2} \cdots (2.12)$$

数値解析に用いた粒子に加わる力

数値解析においていくつかの粒子に加わる力を設定し計算を行った．それぞれの力を示す式を提示する．

重力（＋浮力）：粒子と流体の密度差によって生じる下向き方向の自重

$$F_g = -(\rho_p - \rho_f)V_p g \cdots (2.13)$$

球体に対する流体抗力：流体の流れる方向に働く抗力

$$F_D = \frac{1}{2}\rho V^2 S C_D \cdots (2.14)$$

サフマンメイ揚力<sup>[50]</sup>：粒子周囲の流体速度差による揚力であるサフマン揚力<sup>[51]</sup>をより高い粒子レイノルズ数まで拡張したもの

$$Re_p = \frac{\rho_c |U_c - U_d| d_p}{\mu_c}, Re_\omega = \frac{\rho_c \omega_c d_p^2}{\mu_c} = |\nabla \times U_c| \cdots (2.15)$$

$$F_C = \frac{3}{2\pi} \frac{\sqrt{v_c}}{d_p \sqrt{|\nabla \times U_c|}} C'_L r_d \rho_c (U_d - U_c) \times (\nabla \times U_c + 2\Omega) \cdots (2.16)$$

$$C_L = \begin{cases} 6.46 \cdot f(Re_p, Re_\omega) & for: Re_p < 40 \\ 6.46 \cdot 0.0524 \cdot (\beta Re_p)^{\frac{1}{2}} & for: 40 < Re_p < 100 \end{cases} \cdots (2.17)$$

$$\beta = (1/2)(Re_\omega/Re_p), f(Re_p, Re_\omega) = (1 - 0.3314\beta^{1/2}) \cdot e_p^{-0.1Re_p} + 0.3314\beta^{1/2} \cdots (2.18)$$

圧力勾配力：管内の圧力勾配から，より圧力が低い方へ働く体積力，曲り管の場合内側へ働く

$$F_p = -gradp V_p \cdots (2.19)$$

### 2.3. 管内粒子の受ける力

本実験のスケールにおいて流体が粒子に及ぼす力とその方向について示す.

流体抗力：流体の流れる方向に働く力であり，ディーン流れ中では Fig.2-1 に示すような方向へ働く

$$F_D = \frac{1}{2} \rho V^2 S C_D \cdots (2.14)$$

遠心力：粒子が円形を描くように動く際に外側に向かって働く見かけの力．本件球では曲り管の曲率により働く力を考慮する．Fig.2-2 の方向に働く．

$$F_C = m_p \frac{v^2}{R} \cdots (2.20)$$

重力：粒子の自重により鉛直方向下向きに働く力．Fig.2-3 の方向に働く．

$$F_g = -(\rho_p - \rho_f) V_p g \cdots (2.13)$$

揚力：放物線上の流速を有する管内において粒子が安定である外側に向かう力および，壁面近傍において流体の抵抗により壁面近傍から離れる方向に働く力計算においては多くのディーン流れによる粒子分離法に用いられている Asmolov らによって示された次式を用いた．<sup>[47]</sup>Fig.2-4 の方向に働く．

$$F_L = \rho G^2 a^4 c_{nb} \mathbf{e}_z \cdots (2.21)$$

$$\left( G = \frac{U_m}{d} : \text{shear rate, } a: \text{particle diameter, } c_{nb}: \text{lift coefficient} \right)$$

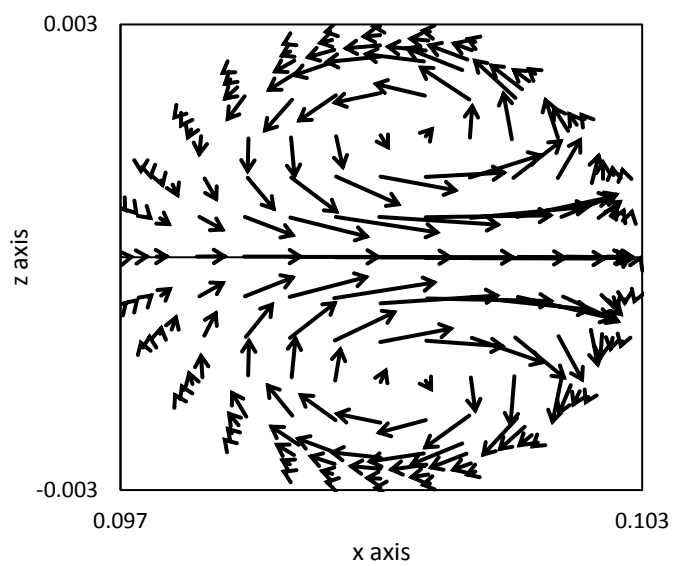


Fig.2- 1 Direction of drag force

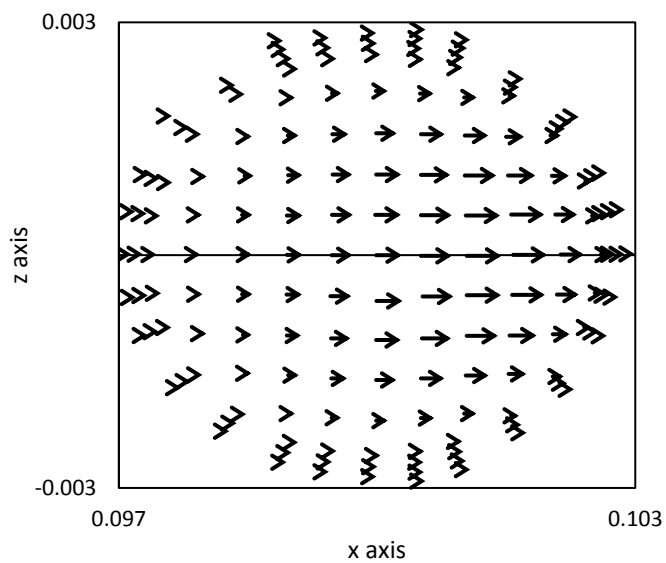


Fig.2- 2 Direction of centrifugal force

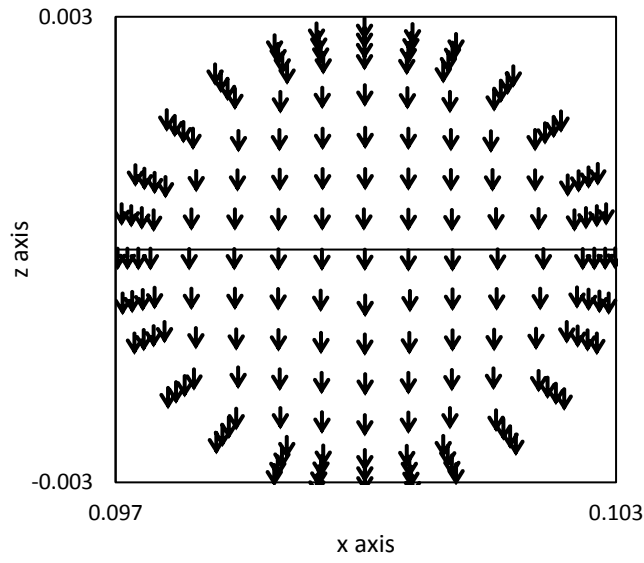


Fig.2- 3 Direction of gravity force

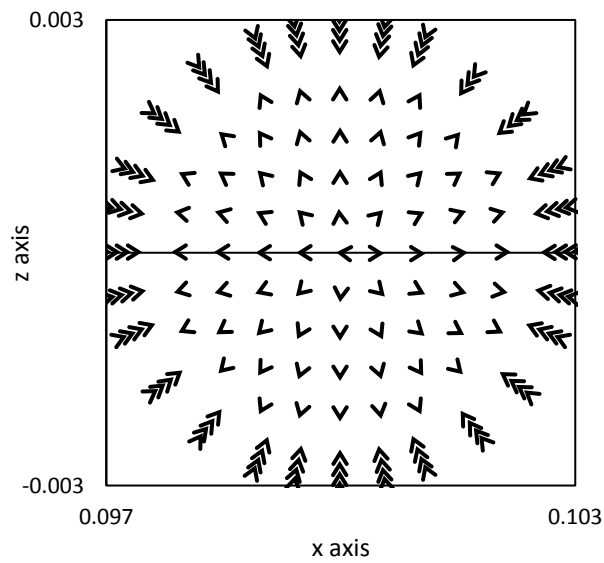


Fig.2- 4 Direction of lift force



## 2.4. 細胞分離理論

流れ場において粒子研濁液と高密度流体が同時に送液されることを仮定すると、界面近傍の粒子はディーン流れによって流路内内側壁面から外側壁面に運ばれ外側壁面近傍に集中することが予測される。このとき粒子に働く外力を考慮した運動方程式を示す。ここでは流体抗力 $F_D$ 、重力 $F_g$ 、遠心力 $F_C$ 、浮力 $F_B$ 、圧力勾配力 $F_p$ 、揚力 $F_L$ について考慮する。

$$m_p \frac{dv}{dt} = F_D + F_G + F_C + F_B + F_p + F_L \cdots (2.23)$$

これまでに研究が行われている管内径 4mm，曲率半径 100mm，密度 1500kg/m<sup>3</sup> の 70 $\mu$ m 粒子における臨界ディーン数付近に関するオーダーは以下のように表される。

$$F_{D,max} \sim 10^{-8}, F_{D,ave} \sim 10^{-9}, F_G \sim 10^{-10}, F_C \sim 10^{-10}, F_B \sim 10^{-10}, F_p \sim 10^{-12}, F_L \sim 10^{-10} \cdots (2.24)$$

このため特に大きな力が働いている垂直方向の力について比較する。Fig.2-5 に示すような上向きのディーン流れによる流体抗力と下向きの重力と浮力の合力（以下重力と記す）の二力について考慮する。粒子が粒子速度 $v_p = 0$ を満たすような状況下において、式(2.25)を満たす状況下において粒子は上向きのディーン流れに乗ることなく管内外側壁面近傍を維持し界面上に捕捉されると予測される。

$$F_G - F_B \geq F_D \cdots (2.25)$$

この式(2-2)において二力が釣りあい、この粒子が静止もしくは速度を維持する場合のディーン数を臨界ディーン数と定義する。条件として指定するディーン数がこの臨界ディーン数を越えた場合に粒子はディーン流れに乗り、流路内をらせん状に進行すると考えられる。一例として従来の研究として行われている管内径 4mm，曲率半径 100mm の曲り管において、ディーン数が 20 での粒子密度 1200kg/m<sup>3</sup> での粒子径が変化した際に粒子が受ける力を Fig.3-6 に、粒子径 70 $\mu$ m での粒子密度が変化した際に粒子が受ける力を Fig.3-7 に示す。Fig.3-6,7 において粒子に働く重力と流体抗力の大きさが同程度になる条件が存在する。これらのことから粒径や密度が小さい粒子はディーン流れによって流路内を移動、粒径や密度が大きい粒子はディーン

流れに乗らずに流路外側壁面近傍に集中して流路を流れる．それゆえに界面近傍における粒子分布は Fig.2-8 のように管内外側壁面近傍において大粒子，内側及び中心部において小粒子の割合が高くなり，粒子分離が可能であると考えられる．

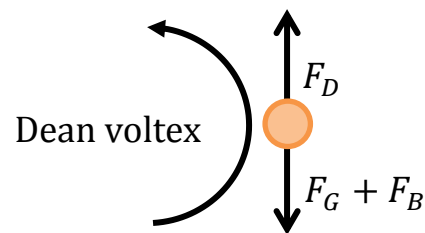


Fig.2- 5 Theory of separation by vertical forces

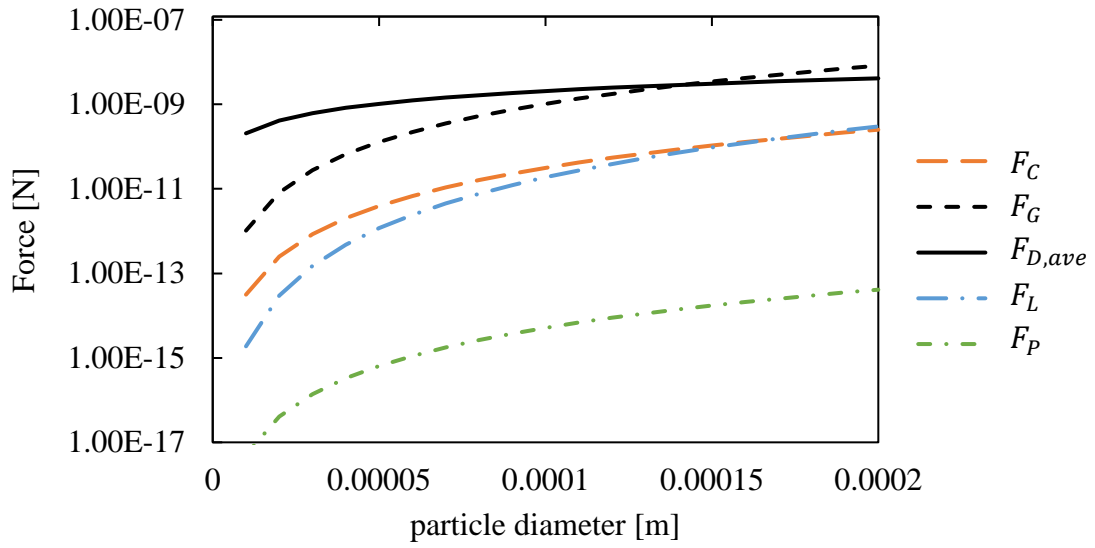


Fig.2- 6 Forces to particles by particle

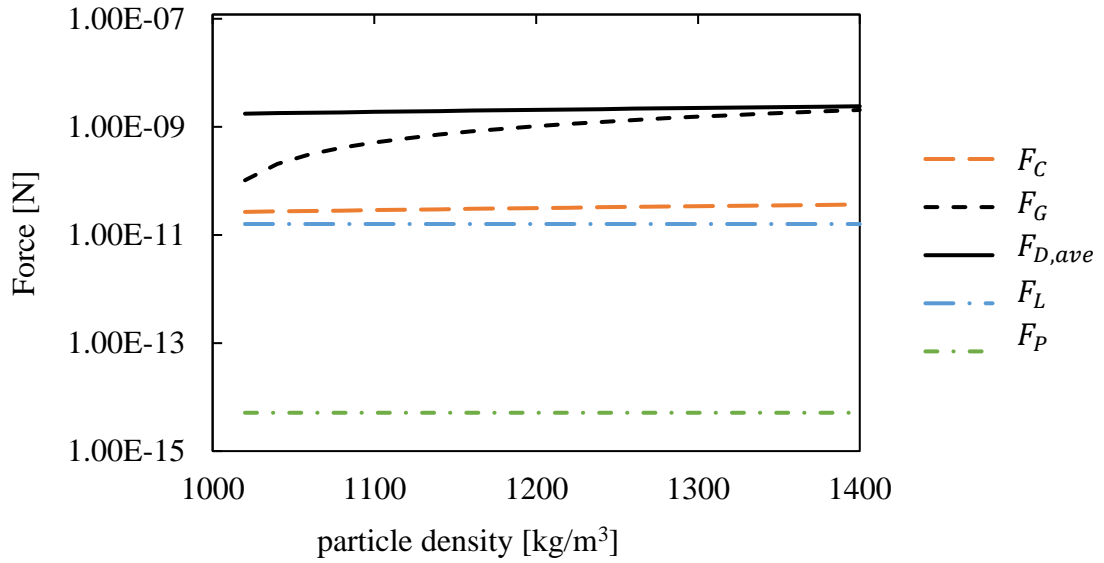


Fig.2- 7 Forces to particles by particle density

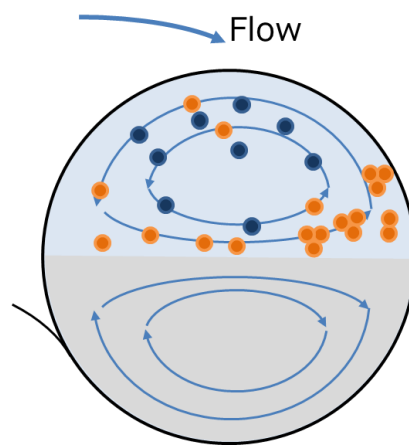


Fig.2- 8 Cell separation methods

## 三章 実験方法

### 3.1. 実験装置概要

実験装置概要を Fig.3-1 に示す．実験装置は Y 字管（内径 1・4mm），Fig.3-2 に示すような管内径  $d=1, 4, 6\text{mm}$ ，曲率半径  $R=100\text{mm}$  のガラス製曲り管，内径 1・4・6mm のビニルチューブにより構成されており，実験に用いる円管は垂直方向の Y 字管，曲り管，直管の形状になっており，送液部のシリンジとはビニルチューブで結合されている．曲り管角度を  $\theta (0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ)$  と定義する．

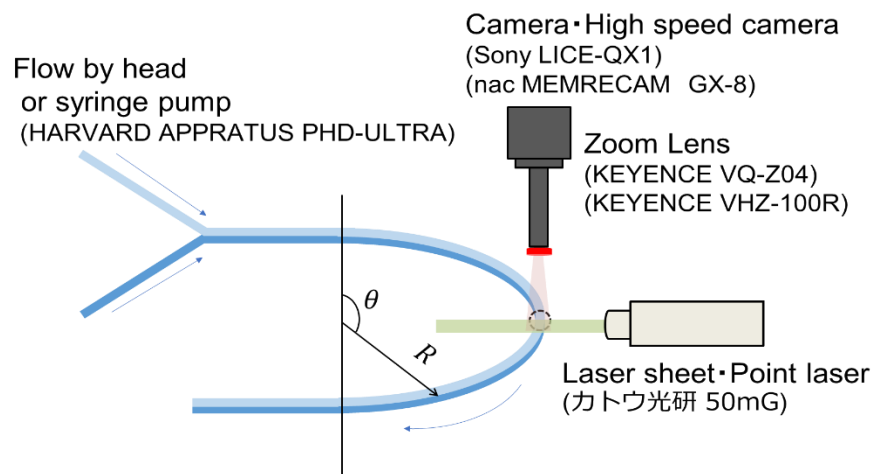


Fig.3- 1 Experimental device

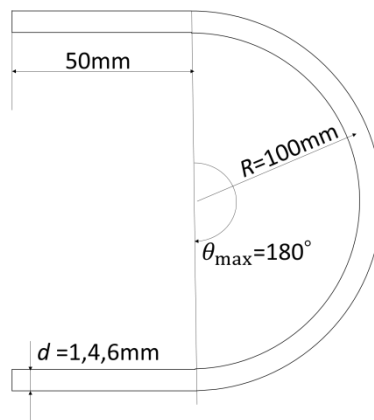


Fig.3- 2 Shape of bending pipe

### 3.2. 送液系

シリンジポンプ (HARVARD apparatus 製 Standard Infuse / withdraw PHD Ultra Syringe Pumps) によりシリンジ (テルモ製 20・50ml) から曲り管内へ 2 液の同時送液を行った。送液量は 2 液とも同量に設定し、管壁面における気泡の形成や送液開始時の誤差を無くすため、流路内を精製水で満たした状態を初期条件とし送液を行った。50ml シリンジを用いた場合界面の形成に必要な流量を十分な時間流すことが可能であるが、極端に流量が低い場合にシリンジポンプのねじ切りによる脈動が残ってしまい界面の形成に影響を及ぼす可能性がある。このため低流量域 (10ml/min 以下) においては 20ml シリンジを用いて送液を行った。

### 3.3. 観察系

観察系にはカメラ（Sony 製 LICE-QX1）もしくは高速度カメラ（ナック製 MEMRECAM GX-8）によりズームレンズ（KEYENCE VQ-Z04, KEYENCE VHZ-100R）を用い、緑色レーザーシート（カトウ光研 50mG）もしくは緑色点光源により曲り管水平方向から観察領域の蛍光粒子を励起し、赤色フィルタ（コダック No.25）を介して管直上より撮影を行うことで通過粒子もしくはその軌跡を観察した。また界面近傍への焦点距離を固定するために Fig.3-3 に示すような足組みをくみ、ズームレンズを介したカメラの焦点距離をレーザーシートで照射できるような系を作成し、Z ステージにより焦点距離にガラス管中心を合わせ観察した。

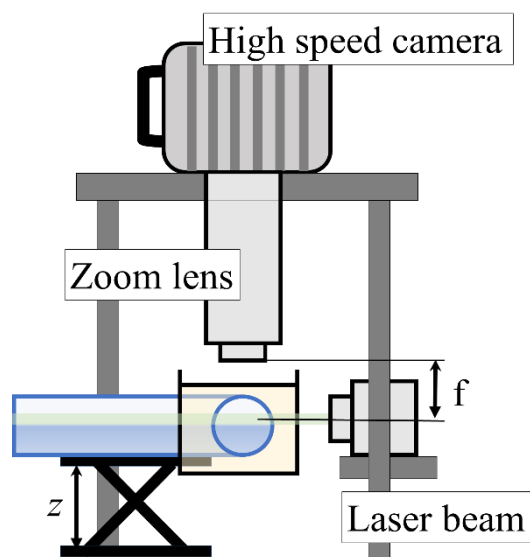


Fig.3- 3 Observation device



### 3.4. 使用流体

実験において培地の代用である低密度流体として精製水，高密度流体として物性値の異なる 3 種類のフッ素不活性液体を用いた．それぞれの物性値について Table3-1 に示す．

Table3- 1 Properties of fluids using experiment

	Density $\rho$ [kg/m <sup>3</sup> ]	Viscosity $\mu$ [Pa · s]	Kinetic viscosity $\nu$ [mm <sup>2</sup> /s]	Surface tension $\sigma_s$ [mN/m]
Pure water	998	$1.0 \times 10^{-3}$	1.0	72.5
FC-40	1870	$4.1 \times 10^{-3}$	2.2	16
FC-3283	1830	$1.5 \times 10^{-3}$	0.8	15
FC-72	1680	$6.7 \times 10^{-4}$	0.4	12

また実験において重要となる 2 流体間の界面張力について表面張力計（CBVP-Z）を用いて計測を行った．計測方法としては白金プレートに働く張力から界面量力を算出するプレート法 Fig.3-4 を採用し，フッ素不活性液体の表面張力が低いことからプレート上面で観察を行う Upper による計測を行った．精製水の表面張力は汚れ等の吸着により時間経過とともに低下やすいが，その影響により界面張力にも変化が見られた．なおフッ素不活性液体に関して時間劣化は見られなかった．このため新規の精製水とフッ素不活性流体の界面張力を測定し用いた．測定した界面張力を Table.3-2 に示す．また観察時の温度条件は室温である 25℃とした．

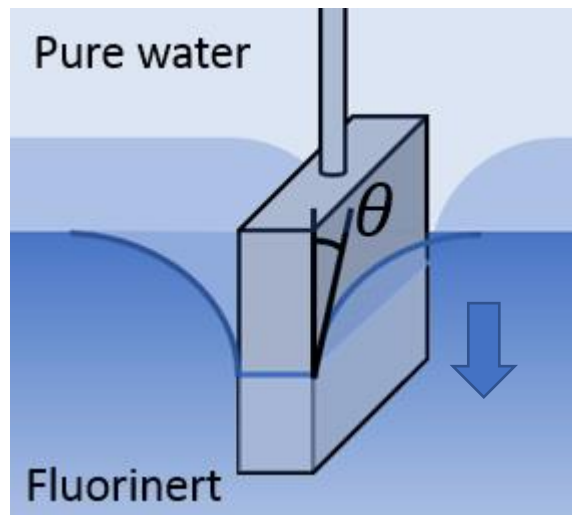


Fig.3- 4 Wilhelmy method (plate method)

Table3- 2 Interfacial tension against pure water

	FC-40	FC-3283	FC-72
Interfacial tension against pure water $\sigma$ [mN/m]	40.0	34.7	29.6

### 3.5. 使用粒子

実験において細胞を模擬した粒子を用いて実験を行った。

実験には粒径 $d_p = 70\mu\text{m}$ , 粒子密度 $\rho_p = 1500$ の多分散メラミン粒子, 着色粒子である粒径 $d_p = 70\mu\text{m}$ , 粒子密度 $\rho_p = 1200$ の生細胞塊模擬蛍光粒子, 粒径 $d_p = 30\mu\text{m}$ , 粒子密度 $\rho_p = 1200$ の生単離細胞模擬蛍光粒子の三種類を用いて実験を行った。それぞれの自作粒子について製作方法及び密度調整法を示す。生細胞塊模擬蛍光粒子の作成において粒径分布中央値が $70\mu\text{m}$ 程度である小粒径合成吸着剤（三菱ケミカル製 ダイヤイオン HP20SS）を蛍光料であるローダミン B を浸透させ攪拌・静置し,  $100\mu\text{m} \cdot 50\mu\text{m}$  のフィルタを介して粒径の調整を行った。また生単離細胞模擬蛍光粒子の作成についてマイクロビーズ（松本油脂製薬製 マツモトマイクロフェアー M-503）を市販の蛍光ペンにより塗装し乾燥, 水中に分散させた際に蛍光が漏れない程度まで洗い  $25\mu\text{m}$  フィルタを介して粒径の調整を行った。それぞれの粒子について作成した濃度 26.4%の食塩水（比重 1.19,  $25^\circ\text{C}$ ）に分散し, 沈殿の有無を確認した。本方法において各粒子は Fig.3-5 に示すように図中左側の比重 1.1 の食塩水中において沈殿, 図中右側の比重 1.2 の食塩水中において中立浮遊したため, 比重 1.2 と定義し実験に使用した。蛍光能に関しては実際に緑色レーザーシートによる励起, 赤色フィルタを介した観察を行い Fig.3-6 に示すように事前に蛍光を確認した。

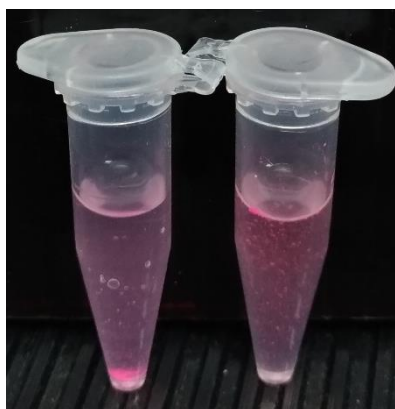


Fig.3- 5 The method of density measurement



Fig.3- 6 The method of checking fluorescence

### 3.6. 数値流体解析概要

フリー数値流体解析ソフトである OpenFOAM を使用し，実験条件の模擬・実験不可能である流体物性値や条件における解析を行った．計算モデルおよびメッシュの作成は FreeCAD により stl ファイルを作成，OpenFOAM の標準ユーティリティである surfaceFeatureExtruct により特徴線を  $150^\circ$  にて抽出し，snappyHexMesh によりヘキサ-ドミナントメッシュの作成を行った．この際境界層として Fig.3-7 に示すように円管壁面に 3 層の細分化メッシュを挿入した．メッシュの妥当性について本研究の対象であるディーン流れの実験から得た速度分布<sup>[1]</sup>や他の解析の文献<sup>[53-54]</sup>との比較を Fig.3-8, Fig.3-9 に示す．Fig.3-8 においてディーン数が 369.5 である場合の速度分布及び流線について，おおよそその速度分布及び流線は一致していることがわかる．また Fig.3-9 において実験値では流入部に一様流，数値解析では発達流れが流入している違いはあるが，それ以降の角度においてはそれぞれ近い速度分布を有していることが分かる．これらのことからメッシュを妥当と判断し，解析を行った．

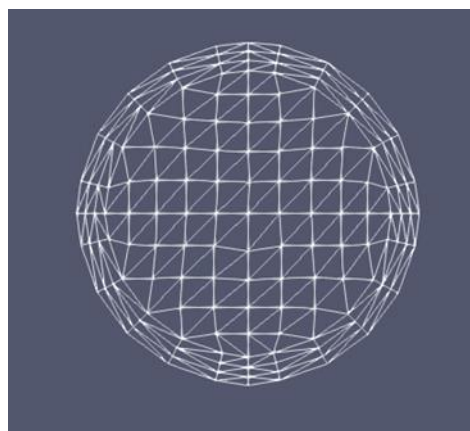


Fig.3- 7 Mesh form of cross sectional area

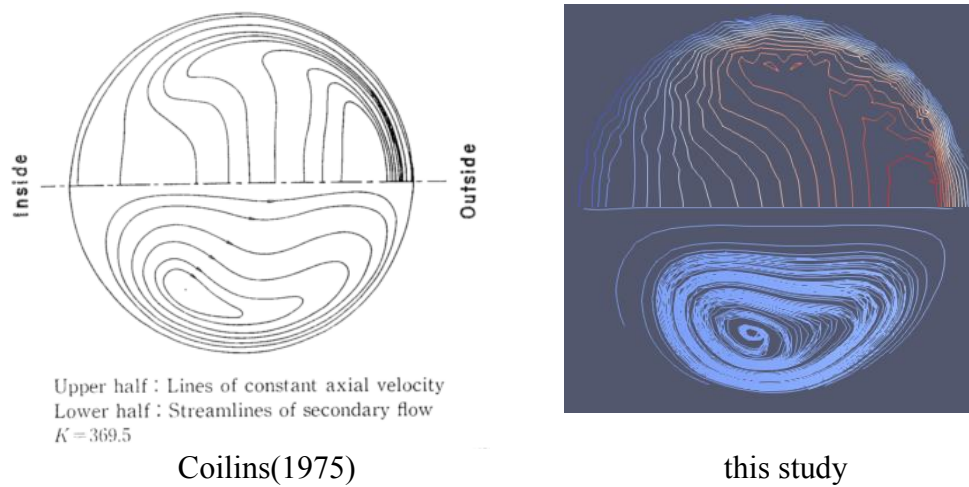


Fig.3- 8 Comparison of analysis result with another analysis<sup>[53]</sup>

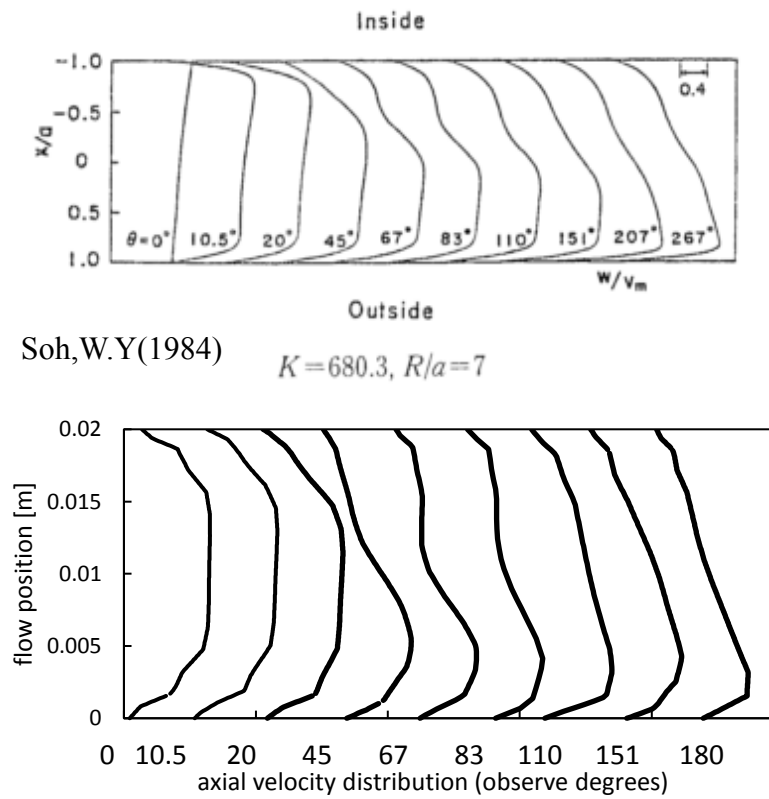


Fig.3- 9 Comparison velocity distribution with another experiment<sup>[54]</sup>

計算に用いたソルバは `potentialFoam`, `simpleFoam`, `interFoam`,  
`icoUncoupledKinematicParcelFoam` である．それぞれの計算手法について示す．

- `potentialFoam` : ポテンシャル流れ（完全流体の流れ）により流体を解くソルバであり，各解析の前処理として使用した．連続の式 (2.6) を圧力差がない状態において計算する手法
- `simpleFoam` : SIMPLR 法 (Semi-Implicit Method for Pressure-Linked Equations) <sup>[48]</sup>を用いた非圧縮性流体の定常乱流解析ソルバ．流体の運動方程式(2.7)と連続の式(2.6)について，圧力方程式(2.8)を連立させて解き，計算結果である速度を用いて運動方程式を繰り返し解くことで収束させる手法
- `interFoam` : 界面捕捉法に基づく VoF (Volume of Fluid) 法<sup>[49]</sup>を用いた非圧縮性，等温・非混合の二流体ソルバ．各メッシュにおける相の体積分率の輸送方程式(2.10)を解くことで求まる密度(2.11)，粘度 (2.12) を用いて界面張力(2.9)を含む流体の運動方程式(2.7)を解く解析方法
- `icoUncoupledKinematicParcelFoam` : 非定常状態における一つの粒子の受動的な輸送を行うソルバ．解析によって得られた速度・圧力により仮想した粒子に力を加えることで粒子軌跡を捕捉する．本研究では重力(2.13)，流体抗力(2.14)，サフマンメイ揚力(2.15)，圧力勾配力(2.19)を加えた．

計算後の各種結果の観察にはフリー可視化ソフトである paraView を用いた。後処理についてはそれぞれの数値解析(界面形成・粒子追跡等)において後述する。また解析に共通して設定した条件について Table に示した。Table に示したように本研究では層流条件による laminar によりシミュレーションを行った。また計算条件についてデータの保存時間について時間の刻み幅を自動調整する adjustableRunTime を設定し、計算の timeStep を自動調整する adjustTimeStep に yes を設定、それぞれの計算の精度を高めるためのクーラン数を表のように設定した。これらの数値は通常 CLF 条件<sup>[52]</sup>が  $Co < 1$  であることから妥当である。

Table3- 3 Setting condition for analysis

Setting items	Setting condition
Simulation type	laminar
writeControl	adjustableRunTime
adjustTimeStep	yes
maxCo, maxAlphaCo	0.2
maxDeltaT	1

### 3.7. 界面形成実験

内径が 1, 2, 3, 4mm のビニルチューブと内径 1, 4, 6mm のガラス管に二液を同量同時に送液し，安定界面の形成条件を調べた．本実験では曲り管ではなく直管もしくは曲り管の直管部にて観察を行った．使用流体は培地を模擬した低密度流体として物性値がほぼ等しい精製水を使用し，高密度流体に 3 種類のフッ素不活性流体を使用した．形成界面について水平方向から観察した解析結果・実験結果の界面を Fig.3-10 に示す．Fig.3-10 に表したように解析・実験ともに管内で二層流を形成したものを水平界面，二層流が破壊され高密度流体と低密度流体が管内を交互に進行する様相を液滴界面と定義し，水平界面を安定界面と定義した．

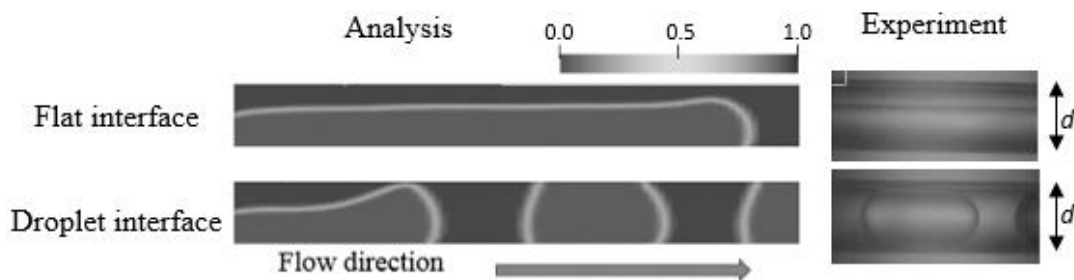


Fig.3- 10 aspects of flow in pipe

また界面形成条件の評価についてレイノルズ数  $Re$ ，ウェーバー数  $We$ ，キャピラリ一数  $Ca$ ，エトベス数  $Eo$  の 4 種類の無次元数を用い，界面様相についてまとめることで評価を行った．

また直管部の管の違いについて壁面が異なる場合 2 液との接触角も異なる場合が存在するため，界面の形状を比較したものを示す．観察部にビニルチューブを用いた場合とガラス管を用いた場合の界面形成について，内径  $d=4[\text{mm}]$  の管について流量  $1\sim 40[\text{ml/min}]$  の範囲で精製水・FC-40 の 2 液の送液した時の界面形状を Fig.3-11 に示す．Fig.3-11 より本条件内ではビニルチューブとガラス管において界面の形成は同様の挙動を示すため，下記実験において管の材質は考慮しないものとする．



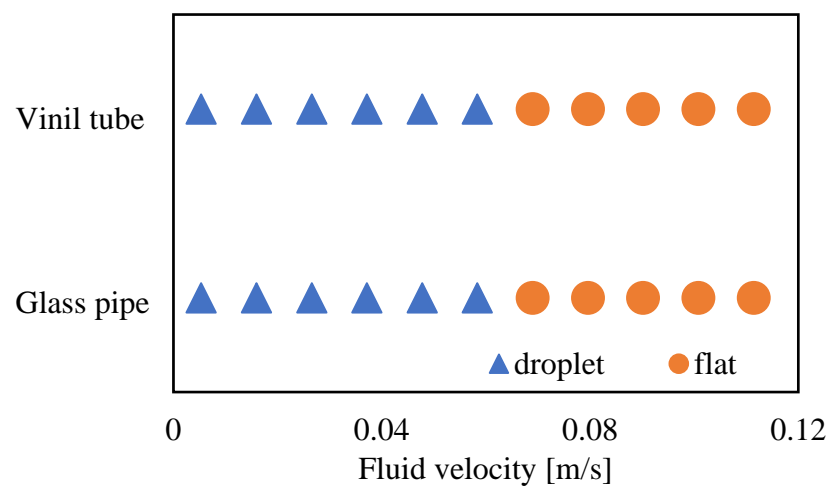


Fig.3- 11 Interface formation at different wall material condition

#### 3.7.1. 管内径変化実験

内径  $d=1, 2, 3, 4$ [mm]の円管それぞれに対しシリンジポンプを用いて送液し，液液界面の形成を行った．それぞれの円管について流量を  $1\sim 40$ [ml/min]の範囲で変化させ，形成した界面の様相を分類し，無次元数による評価を行った．

#### 3.7.2. 供試流体変化実験

内径  $d=4$ [mm]の円管を用い，高密度流体について 3 種類のフッ素不活性液体を用い変化させ，管内に形成する液液界面の様相を観察した．それぞれの 2 流体を用いた条件において流量を  $1\sim 40$ [ml/min]の範囲で変化させ，形成した界面の様相について評価を行った．供試流体変化時にそれぞれの高密度流体の混合を避けるため，実験の後処理及び前処理として精製水・アルコールによる洗浄，乾燥を行った．

### 3.8. 数値流体解析による界面形成

Openfoam を用いて数値流体解析を行い，形成界面様相を比較した．計算ソルバとして多層流ソルバである interFoam を用いて計算を行った．

内径 1, 2, 3, 4, 5, 6mm の直円管モデルを作成し，実験と同様界面形成について評価を行う．モデルの長さは管直径の 12.5 倍の長さとした．断面メッシュの形状の一例を Fig.3-12 に示す．Fig.3-12 に示すように入り口部を上下に二分し，上側に低密度流体，下側に高密度流体を指定し，初期条件として低密度流体が満たされている条件下において解析を行った．また解析における境界条件を Table3-4 に示す．

Table3- 4 Boundary condition

	Inlet	Outlet	Wall (side)
Velocity condition	Set flow rate	no gradient	0(non-Slip condition)
Pressure condition	no gradient	0	no gradient

各種値について Table に示す範囲内でフッ素不活性液体におけるウェーバー数  $We$ ，キャピラリー数  $Ca$  が  $0.02 \leq We_f \leq 10$ ， $0.001 \leq Ca_f \leq 0.007$  となるように変化させることで，界面の形成条件における静的接触角  $\phi$ ，動粘度  $\nu$ ，密度  $\rho$ ，界面張力  $\sigma$  等の影響を検討した．

Table3- 5 Analysis fluid property condition

	Minimum of the value	Maximum of the value
Velocity $U$ [m/s]	0.007	0.085
Density $\rho$ [kg/m <sup>3</sup> ]	770	8800
Kinematic viscosity $\mu$ [mm <sup>2</sup> /s]	$5 \times 10^{-7}$	$3.44 \times 10^{-5}$
Interfacial tension $\sigma$ [N/m]	0.02	0.06
Contact angle $\phi$ [degrees]	5	160

結果の観察方法として解析モデルに対して垂直方向の進行方向である  $y$  軸において Slice し、体積分率である  $\alpha$  について断面の観察を行った。断面について 2 流体の挙動と界面形状について実験と同様の評価を行った。

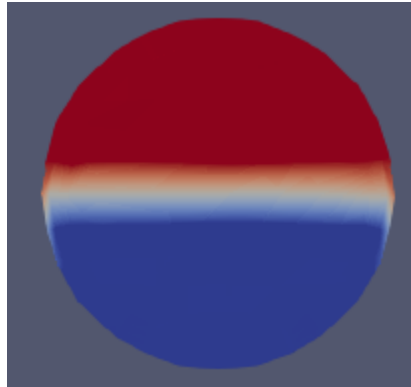


Fig.3- 12 Straight pipe model of analysis

### 3.9. 曲り管内液液界面形成実験・解析

#### 3.9.1. 曲り管内界面形成実験

内径 1, 4, 6mm の直管を有する曲り管を用いて液液二層流の形成実験を行う．密度の異なる 2 流体を Y 字管により合流，シリンジポンプにより送液を行い  $\theta = 180^\circ$  において形成界面の観察を行った．指定した流速はディーン数が  $20 \leq De \leq 60$  となる範囲である．

#### 3.9.2. 曲り管内液液二層流様相のための数値流体解析

interFoam を用いて 2 液の安定界面形成条件について調査した．解析モデルは助走区間を有した内径 1, 6mm, 曲率半径 100mm,  $180^\circ$  の曲り管であり境界条件，初期条件は直管における解析と同様であり，流入部も直管時と同様に上半分に低密度流体，下半分に高密度流体を流入している．流出部付近について垂直方向の断面における体積分率  $\alpha$  を観察することで，実験と同様に  $\theta = 180^\circ$  における界面の形成について評価した．

### 3.10. 粒子分離実験

内径 1, 4, 6mm の曲り管に Y 字管を介して下側から高密度流体としてフッ素不活性液体, 上側より三種類の細胞模擬粒子を精製水に攪拌した粒子懸濁液を

$30 \leq De \leq 100$  の範囲で送液を行った. 曲り管部 180 度部分において直上より粒子および粒子軌跡を観察した. 観察領域の大きさとズームレンズの倍率を合わせるため, 4, 6mm 管の観察では VQ-Z04 を, 1mm 管の観察では VHZ-100R のズームレンズを用いて観察を行った. また粒径の  $70\mu\text{m}$  粒子の観察にはより広い範囲において粒子を観察するため緑色レーザーシートを用い, 粒径  $30\mu\text{m}$  の粒子の観察にはより蛍光させるため比較的強い光である点光源を用いて観察を行った. 今回の実験ではフッ素不活性液体に FC-40 を用いた.

観察された粒子画像群に関して管内粒子位置を整理し評価するため, Fig.3-13 に示すように観察された粒子画像をある任意の管断面に注目して観察を行う. 画像解析ソフトには ImageJ を用いた. 動画および画像群を ImageJ に取り込んだのち, 任意の断面に直線を引き Fig.3-14 に示すような image→stacks→reslice を用いて 1 枚の画像とした. 管の中心部に蛍光が多く光ってしまう等の背景を削除するために Process→Subtract Background により 5pixel 幅で処理を行った. これは通過粒子よりも少し大きな値である. Image→Adjust→Threshold により閾値を設定し Fig.3-15 に示すような粒子の通過部分のみ白く, それ以外の背景を黒く示すように処理を行った. これらの処理により Fig.3-16 に示すように輝度値を調整した. その後 Analysis→Plot profile により輝度値の分布を取得した. 得られた輝度値分布に関して Fig.3-17 に示すような流路を 10 分割した場合の外側 2 割を通過する粒子の割合を計算し, 粒子分離率  $r_s$  として定義し, 最も外側に粒子が偏在する条件である臨界ディーン数について評価を行った.

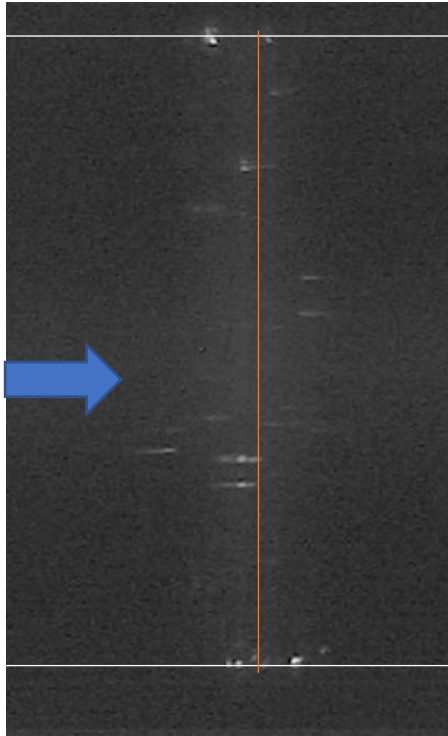


Fig.3- 13 Measurement image

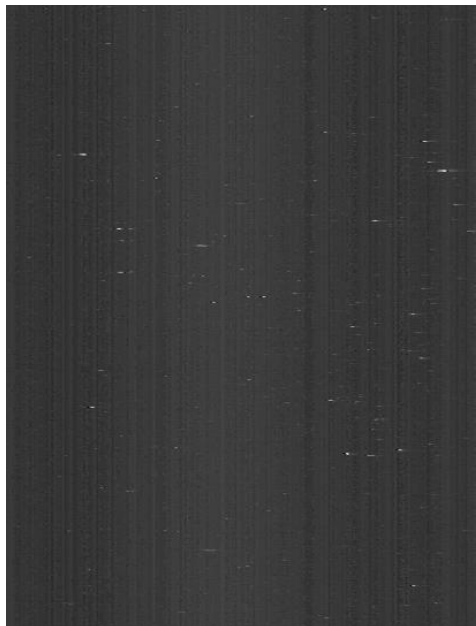


Fig.3- 14 Reslice image



Fig.3- 15 Image of position of passing particles



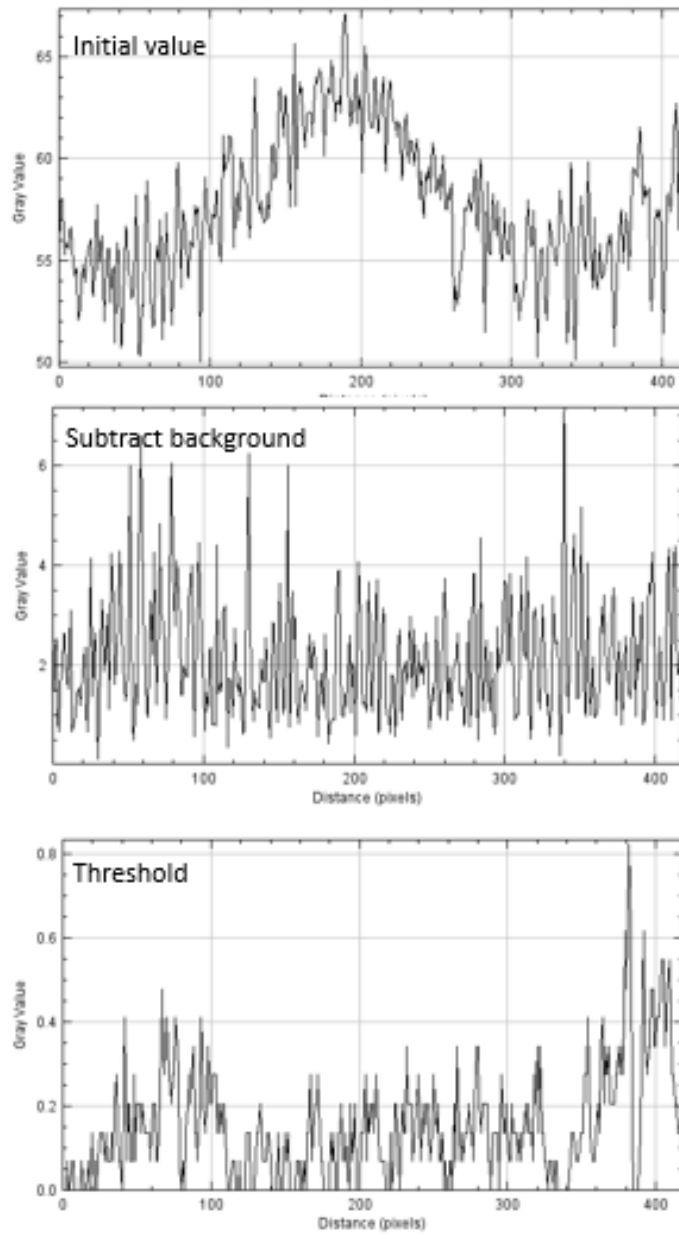


Fig.3- 16 Process of image luminance

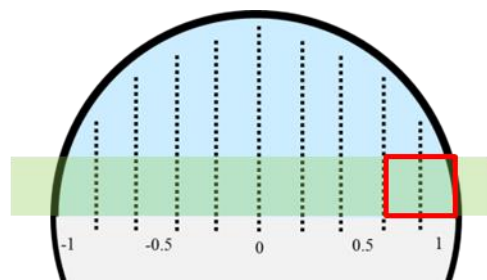


Fig.3- 17 Defination of separation ratio

#### 3.10.1. 密度差粒子選別実験

4mm 管における多分散メラミン粒子と生細胞塊模擬粒子の粒子分離率, 6mm 管における生細胞塊模擬粒子の粒子分離率の計測を行った. これらを比較し同粒径の密度差を有する場合における臨界ディーン数の変化について検討した. 観察範囲は  $20 \leq De \leq 100$  である.

#### 3.10.2. 粒径差粒子選別実験

同密度の粒径差を有する粒子における粒子分離率, 臨界ディーン数の差異について検討を行った. 比重 1.2 の粒子について, 粒径  $30\mu\text{m}$  生単離細胞模擬粒子と粒径  $70\mu\text{m}$  の生細胞塊模擬粒子による細胞懸濁液を用いて内径 6mm の管において粒子分布を観察した. 観察範囲は  $20 \leq De \leq 100$  である.

#### 3.10.3. 管径変化による粒子選別検討実験

管径を変化した際の粒子分布の変化について検討するため, 内径が 1, 4, 6mm の曲がり管を用いて粒子分布の観察を行った. 6mm 管多分散メラミン粒子を用いて粒子分布を観察し, 4mm 管を用いた際の粒子分布と臨界ディーン数の変化を調査した. また 1mm 管における生単離細胞模擬粒子と生細胞塊模擬粒子での粒子分布について観察し, 6mm 管の実験結果と比較を行うことで管径の変化における粒子挙動について検討を行った.

### 3.11. 数値流体解析・数値計算による流体挙動・粒子追跡

#### 3.11.1. 数値解析による管内流体挙動見積もり

前処理である potentialFoam, SIMPLE 法による simpleFoam を用いて助走区間を有する曲がり管内单相流の流れを解析し，流速や二次流れの見積もり等を行う．用いた解析モデルは  $90^\circ$  の曲がり管であり，内径は 1mm, 6mm である．実験と同範囲である  $De=20,30,40,50,60,80$  となるような流速を入口に指定し，境界条件は Table3-3 と同様の設定として解析を行った．解析結果について paraView を使用し  $90^\circ$  部分である  $y=0.1$  において Slice→Surface Vector→Grpifs により断面流速をベクトルとして観察した．また同断面について管中心である  $z=0$ ，外側壁面近傍である  $x=0.375d$  について plot over line を行うことで二次流れ流速を定量的に評価した．

また二層流における断面流速について考察を行うため，Fig.3-18 に示すような断面を有する曲がり管を模擬して解析を行う．断面の形状はエトベス数が 1 の場合と 10 の場合について理論的な形状を文献値<sup>[55]</sup>から参考したもの，半円管のものの三種類について potentialFoam, simpleFoam を用いて解析する．境界条件について Table3-5 に示すように流入部，流出部，管壁面に関しては円管時と同様の境界条件であるが，高密度流体との接触部である界面上について拘束を設けない条件により二層流を想定した．これらの解析において円管と同様の処理を行うことで流速や二次流れ流速の違いを比較した．

Table3- 6 Boundary condition of half pipe analysis

	Inlet	Outlet	Wall (side)	Interface
Velocity condition	Set flow rate	no gradient	0	Slip ( $v \neq 0$ )
Pressure condition	no gradient	0	no gradient	no gradient

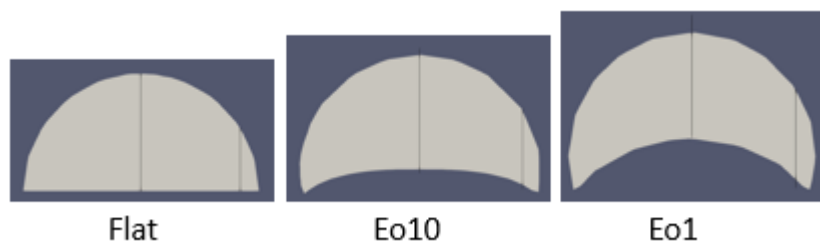


Fig.3- 18 Cross-section shape of half pipe analysis

### 3.11.2. 数値解析による粒子追跡

曲がり管モデルや二層流を模擬した半円管モデルにおいて仮想粒子の粒子追跡を行うことで粒子の軌跡を観察し、粒子分離・選別の可能性に関して検討を行う。流体挙動の解析と同様の解析モデルを用い、icoUncoupledKinematicParcel-Foamにより流体→粒子方向への力の反映のみの 1way による解析を行った。流体の境界条件としては流体挙動解析時と同様であり、ディーン数が 20, 40, 60 の条件における比重 1.2, 粒径  $30\mu\text{m}$ ・ $70\mu\text{m}$  粒子の生単離細胞と生細胞塊を模擬した仮想粒子を投入し軌跡を追跡した。粒子モデルに加わる力として球形への流体抗力, 圧力勾配力, サフマン揚力を設定した。解析結果について openFoam の標準ユーティリティである foamToVTK を用いて粒子軌跡データを VTK ファイルに変換し, paraView にて Temporal particle to pathlines→save により csv 出力し, excel 上にて回転行列をかけることにより粒子軌跡を同一平面上に plot し, 粒子挙動に関して定性的な評価を行った。

## 四章 結果考察

#### 4.1 界面形成実験

本項では管内径を変化した際の形成界面形状の評価，高密度流体である供試流体を変化した際の形成界面形状の評価，および数値流体解析において計算した界面形状の評価を行った．実験及び解析において観察された2種類の界面形状を Fig.4-1-1 に示す．Fig.4-1-1 に示すように管内を密度の異なる2液が交互に進行する液滴界面と管内を二層流として進行する水平界面が観察された．以下においてこれら二種類の界面形状を流体の流動条件ごとに分類を行うことで水平界面の形成条件を示す．

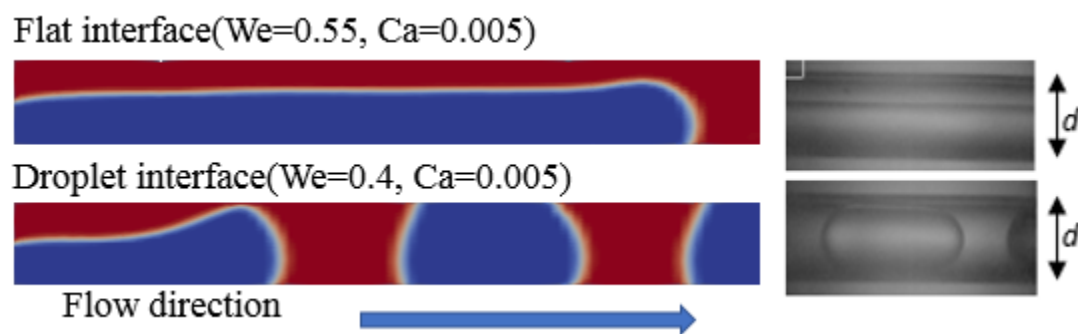


Fig.4-1- 1 Shapes of interface at experiment (left) and analysis (right)



#### 4.1.1 管径変化実験

管の直径を変化させた際の管内二層流形成実験において、観察された二種類の界面と管内流体速度の関係を Fig.4-1-2 に示す. Fig.4-1-2 より形成する界面の形状は流速に依存し、流速が小さい場合に液滴界面、大きい場合に水平界面を形成することがわかる. この結果について無次元数により整理を行い、管径変化時におけるレイノルズ数と界面形状の関係、ウェーバー数と界面形状の関係をそれぞれ Fig.4-1-3, Fig.4-1-4 に示す. Fig.4-1-3 より低レイノルズ数域において液滴界面が高レイノルズ数に遷移する際に管内二層流を形成すること、Fig.4-1-4 よりレイノルズ数と同様に高ウェーバー数において管内二層流の形成を示した. これらのことから慣性力が粘性力、二流体の界面張力に対し大きくなると管内二層流を形成することを明らかにした. このように本実験の条件においてはレイノルズ数・ウェーバー数が増加した際に界面形状が変化する同様の傾向を示した. 本条件では粘性力は流体速度によって変化するが、二流体の界面張力は固定の値である. これらのことから慣性力による管内液液二層流の形成の要素として粘性力の影響は小さいと考察することが可能である. このことから本研究では界面形成評価においてウェーバー数を主として用いる. また本実験において変化させた管径やそれに基づくレイノルズ数はディーン数を形成する重要な要因であるため粒子分離実験にて用いる曲率半径  $R=100\text{mm}$  におけるディーン数と界面様相の関係を Fig.4-1-5 に示し考察する. Fig.4-1-5 から管径が小さい場合により低いディーン数域において管内液液二層流の形成が可能であることを示した. これは管径が小さい場合、管内の流体流速が同様であっても低いレイノルズ数を示すためであり、ディーン数の構成要素である  $\sqrt{\frac{d}{2R}}$  の増大よりもレイノルズ数の減少の割合が大きいことに由来する. これらのことからウェーバー数のオーダーが1以上である場合に慣性力による管内液液二層流は形成し、管内径が小さい場合により低いディーン数域について二層流の形成が可能である.

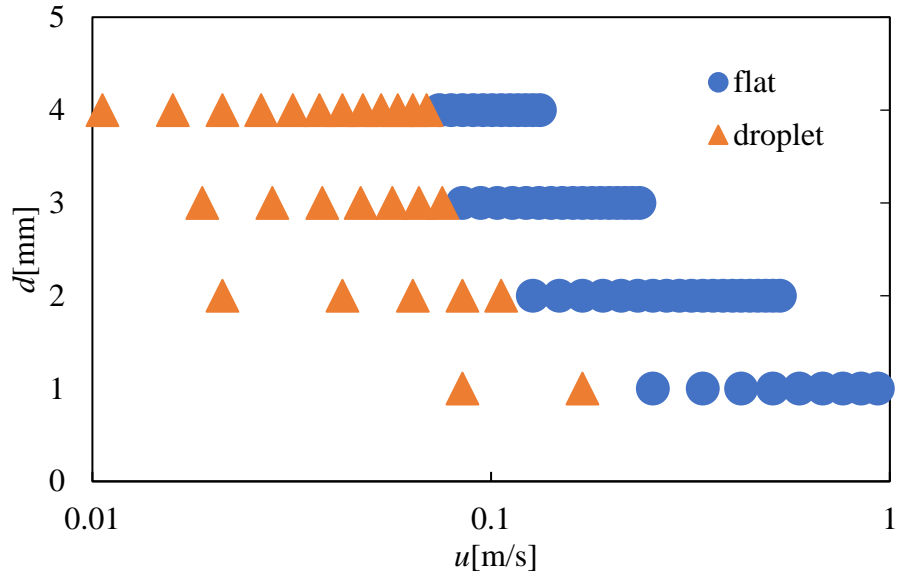


Fig.4-1- 2 Interface aspects and relationship between flow velocity and pipe diameter

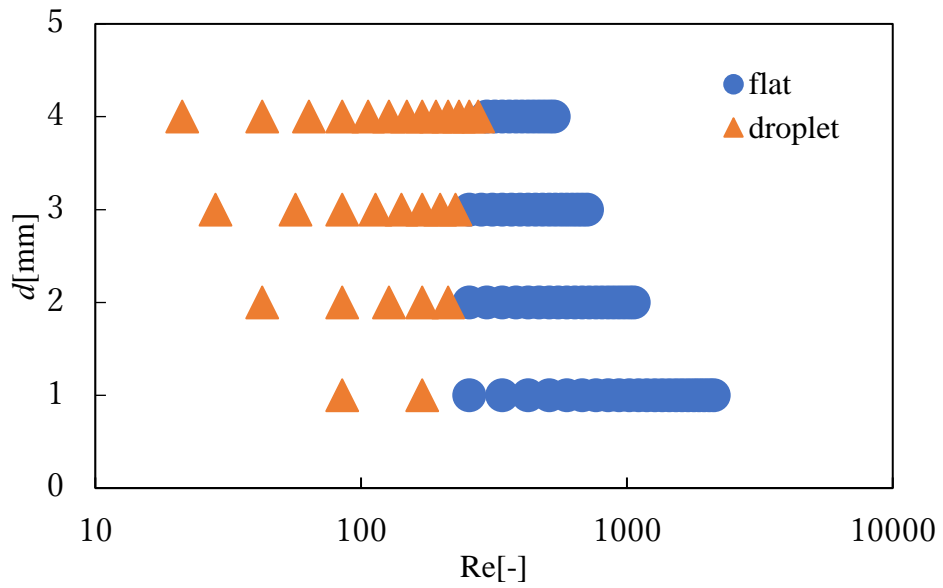


Fig.4-1- 3 Interface aspects and relationship between Reynolds number and pipe diameter

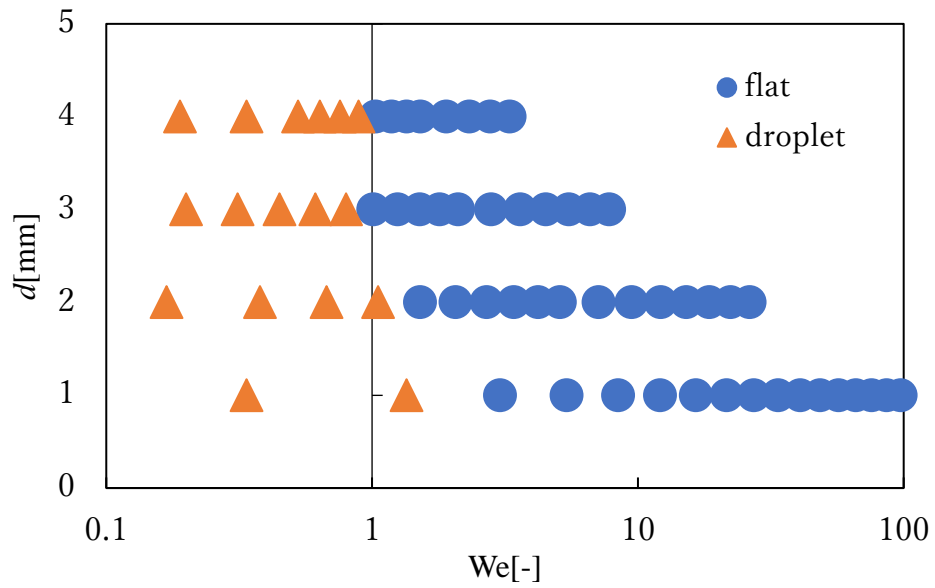


Fig.4-1- 4 Interface aspects and relationship between Weber number and pipe diameter

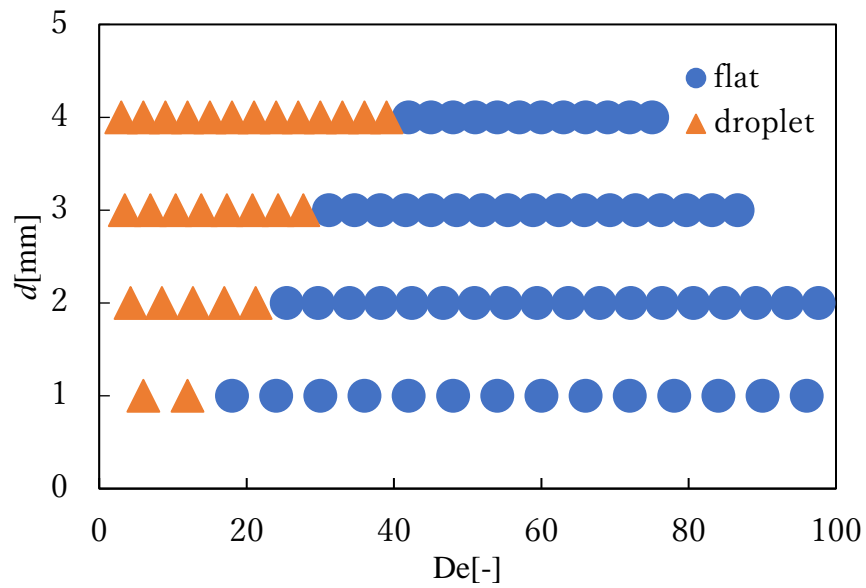


Fig.4-1- 5 Interface aspects and relationship between Dean number and pipe diameter

#### 4.1.2 供試流体変化実験

高密度流体を物性値のことなる流体に変化させた場合の界面様相について観察した実験について用いた三種類の高密度流体ごとのウェーバー数による界面形状変化についてFig.4-1-6に示す。Fig.4-1-6より供試流体を変化させた場合における実験においても界面形成条件はウェーバー数により評価することができることを示した。またこの結果について高密度流体の物性値は特に粘度の値や界面張力の値が異なるため、キャピラリー数を用いて評価を行う。レイノルズ数とキャピラリー数によって表したグラフをFig.4-1-7に示す。Fig.4-1-7において粘度の低いFC-72ではレイノルズ数600付近において液液二層流が形成しているが、粘度の高いFC-40ではレイノルズ数300程度において液液二層流が形成しており、レイノルズ数による比較をする場合であれば粘度がより大きい高密度流体において広い範囲での液液二層流の形成が可能であることを示した。

管径変化と供試流体変化実験を複合し、界面形状をウェーバー数・キャピラリー数によってまとめたものをFig.4-1-8に示す。双方の実験において同様のウェーバー数1以上の高ウェーバー数領域において安定液液二層流を形成することを示した。

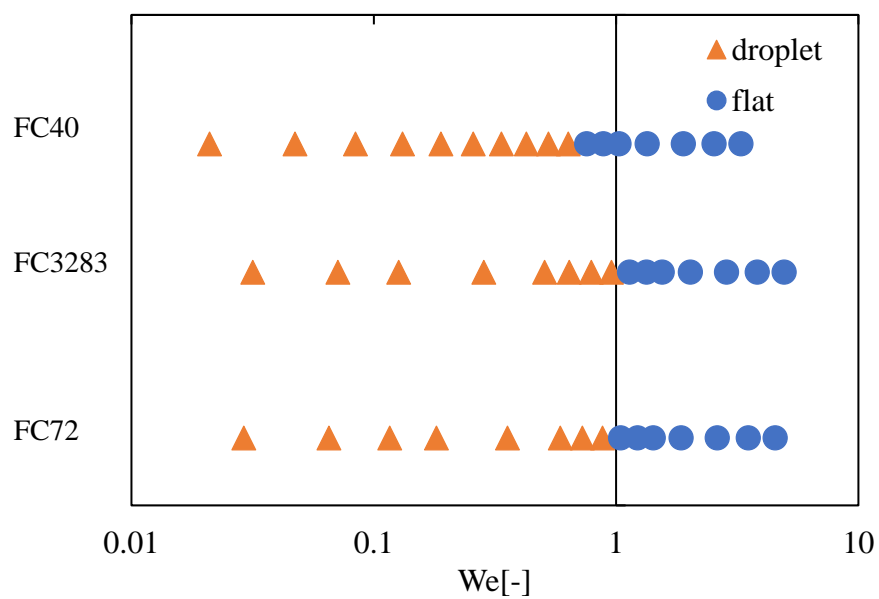


Fig.4-1- 6 Interface aspects and relationship between Weber number and fluid property

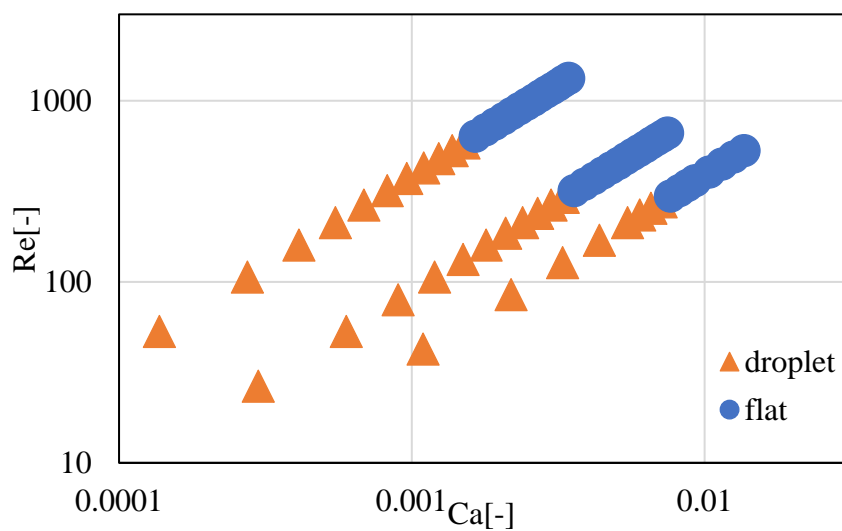


Fig.4-1- 7 Interface aspects and relationship between Reynolds number and Capillary number

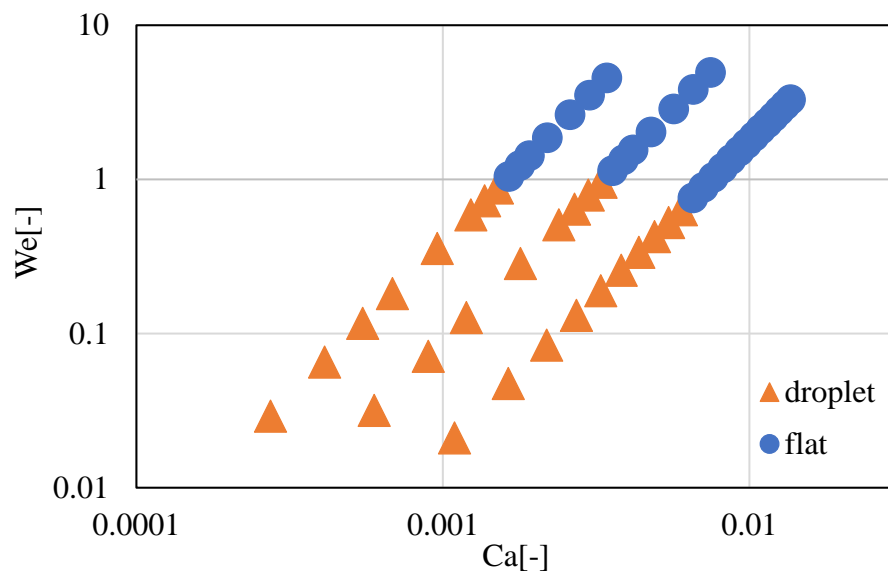


Fig.4-1- 8 Interface aspects and relationship between Weber number and Capillary number

#### 4.1.3 数値流体解析

二層における数値流体解析を行うにあたって、2液の接触角において記述する。解析条件として、壁面に対する2液の接触角を10度～160度の範囲において変化させることによって実験における界面の形成条件との比較を行った。以下に実験において界面形状が液滴から二層流に遷移する条件である管内径 $d=4\text{mm}$ 、レイノルズ数200の条件における直管での解析の断面を示す。Fig.4-1-9により界面が液滴と二層流に遷移する条件は静的接触角 $\phi$ が40-60度、120-140度であることがわかる。またFig.4-1-10にフッ素不活性液体のFC-40上に精製水を滴下した場合の画像、Fig.4-1-11に曲り管内において形成した液滴状界面の実験画像を示す。Fig.4-1-10より計測できる2液の接触角の大きさは60度前後であり、数値流体解析の結果と比較を行うと同様の結果である。またFig.4-1-11において観察される液滴状界面のフッ素不活性流体液滴の形状と数値流体解析における液滴の形状を比較すると60度における結果のものが実験と近い形状を有していることが分かる。また数値流体解析を用いて、同様の流体物性値・接触角60度の条件における流速を大きくし、レイノルズ数300の時の場合の界面形状は水平状の界面であり、解析結果が実験結果と同様であるため、これ以降の解析には静的接触角 $\phi$ として60度を採用した。

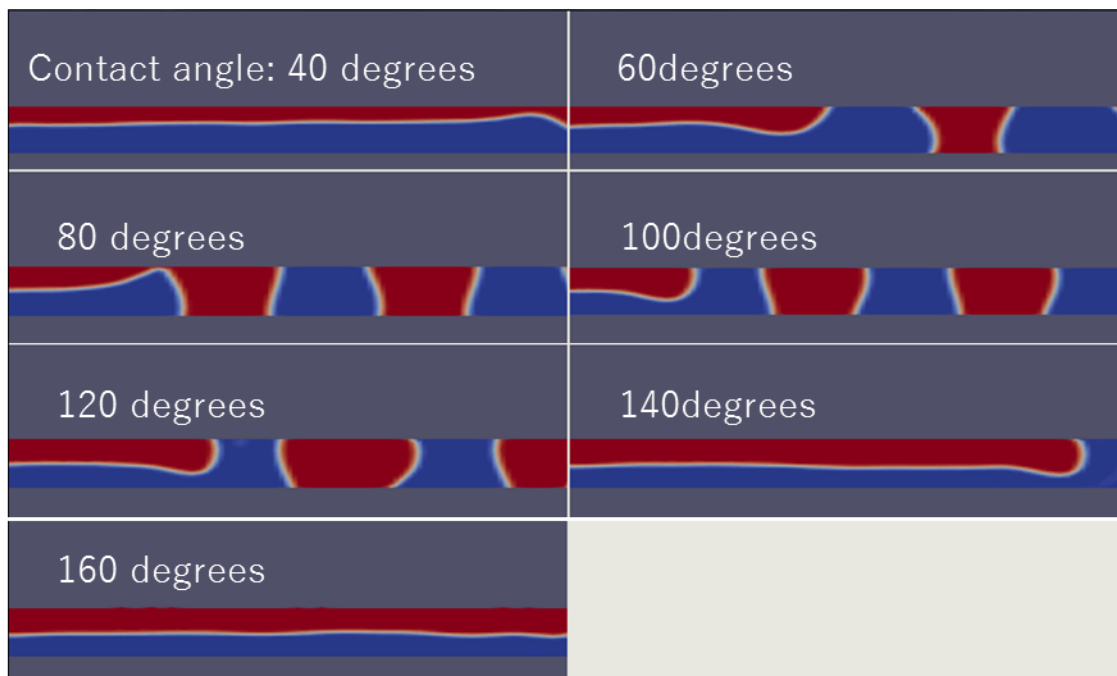


Fig.4-1- 9 Analysis result about setting value of contact angle

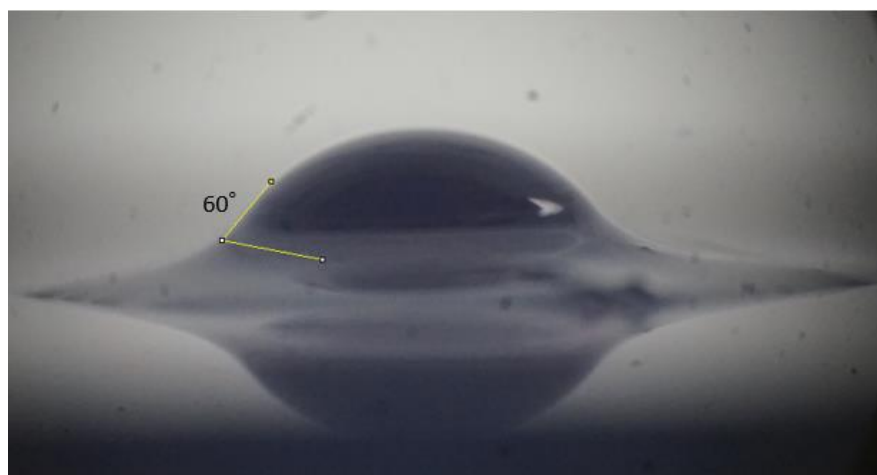


Fig.4-1- 10 Picture of pure water on fluorinert



Fig.4-1- 11 Shape of droplet interface in glass pipe



次に実験と同様の流体物性値・実験条件を用いて、流速を変化させることによって得られた界面様相をFig.4-12に示す。Fig.4-12において得られた解析結果と実験結果を比較すると同様の界面様相、遷移条件を示していることからこの解析を妥当と判断した。

次に実験不可能な物性値や条件における解析結果を示す。流速が0.05, 0.075[m/s], 高密度流体密度が $1860\text{kg/m}^3$ の固定した条件において、界面張力・粘度をそれぞれ変化させられた界面形状の評価を行った。界面様相をウェーバー数、キャピラリー数によって整理したものをFig.4-13に示す。流速0.05m/sのものが実線であり、流速0.075m/sのものが破線である。界面張力を変化させた場合斜め上や下などウェーバー数が大きく変化し、粘度を変化させた場合ウェーバー数については変化せずにキャピラリー数が大きく変化する。Fig.4-13において界面張力を変化させた場合、界面張力が小さくなるほどにウェーバー数、キャピラリー数が上昇しウェーバー数による界面形状遷移条件である値を超えた条件において二層流を形成したことがわかる。一方粘度を変化しキャピラリー数が一定の値を超えた条件において界面が二層流に変化した。これは界面張力の液滴が球になろうとする力に対し、粘性力による現在の形状を保とうとする力が支配的になったことが考えられる。このようなウェーバー数とキャピラリー数による界面形状の変化はutadaら<sup>[19]</sup>によって報告されているdroplet-jetting遷移(Fig.1-2)と同様の形状を示していることがわかる。文献値と比較して界面形状の変化位置がウェーバー数・キャピラリー数共に小さい値となっている点に関して、droplet-jetting遷移と異なり液液二層流の形成では壁面との接触があり、この壁面との二流体の接触角が依存していることが考えられる。

また二層流形成が起こらない低ウェーバー数域である条件において，キリヤピラリ一数と界面張力を固定し，流体速度・密度・粘度を変化させた場合の界面の状態について，より変化させた密度とウェーバー数の関係をFig.4-14に示す．Fig.4-14より高密度流体の密度が大きい場合に低ウェーバー数域についても液液二層流が形成していることを示した．

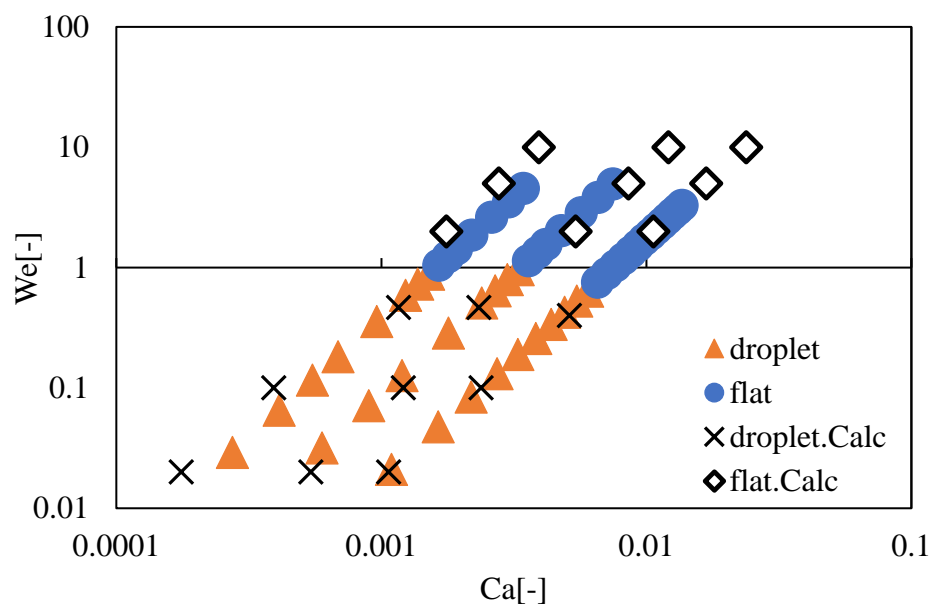


Fig.4-1- 12 Analysis result of interface aspects on the experimental condition

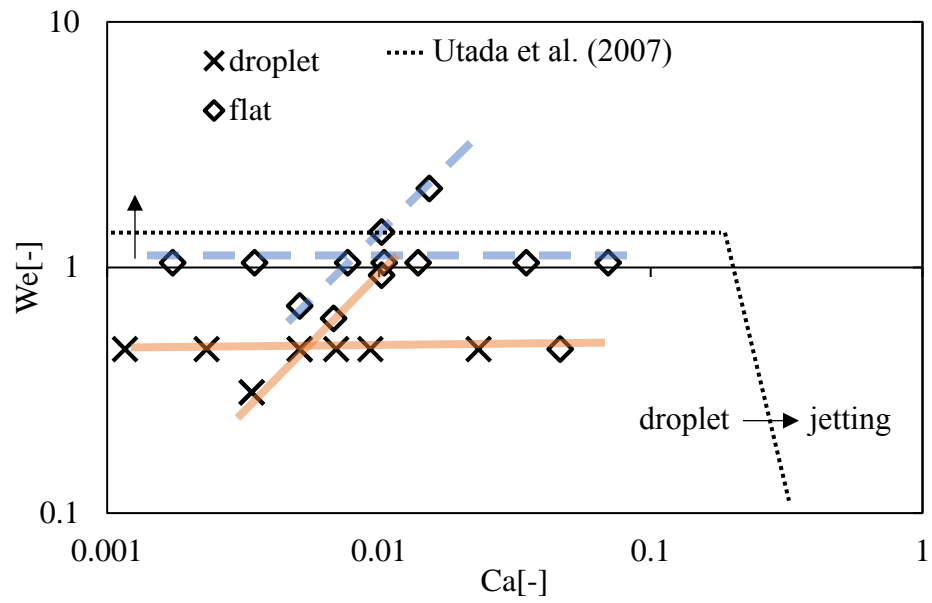


Fig.4-1- 13 Interface aspect on various properties by CFD

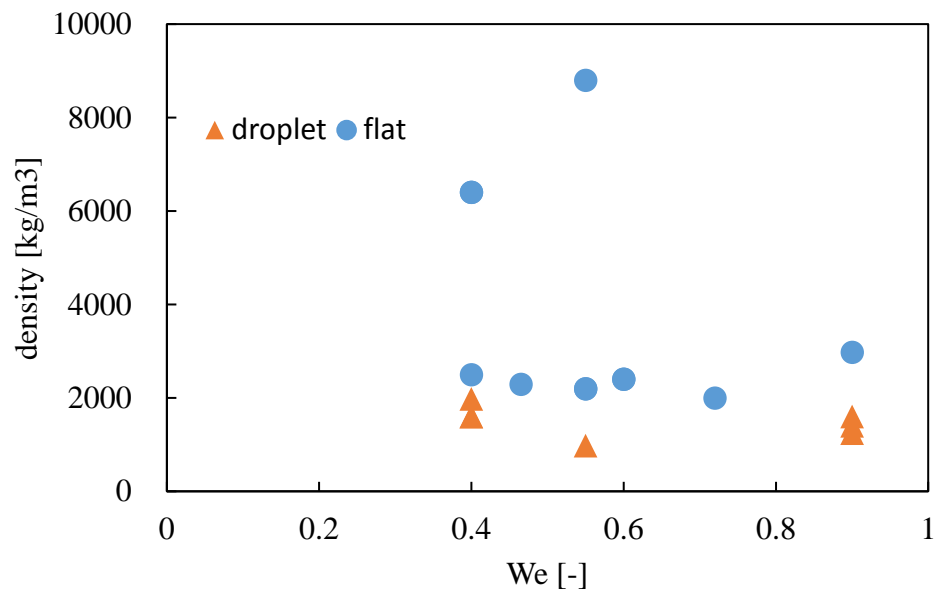


Fig.4-1- 14 Relationship between interface aspect and density

#### 4.1.4 流体の密度差による水平界面形成

前節にてキャピラリー数を変化させた際、密度が比較的大きい条件においてはウェーバー数やキャピラリー数が低い条件下においても液液二層流を形成する様相を示した。これは密度が大きい場合に働く重力が界面張力に対し支配的になったからであると考えられる。そこで重力と界面張力の比であるエトベス数により評価を行った。数値流体解析において、管内径を1, 2, 3, 4, 6mmに変化した場合や、各ウェーバー数において流体密度を変化させた際の界面様相についてエトベス数とウェーバー数でまとめたものをFig.4-1-15に示す。Fig.4-1-15より流体の密度を大きくした場合だけでなく、管内径を大きくした場合など高エトベス数において二層流を形成していることから、ウェーバー数が低い範囲内においてもエトベス数がある値以上である場合には液液二層流を形成する可能性を示した。エトベス数が4～5付近を境界として界面形状が変化している点について、同じく液液二相におけるノズルから形成する液滴径とエトベス数の関係を示した式<sup>[56]</sup> (4.1) を以下に示し考察する。

$$\frac{d_p}{d_n} = 1.62 \left( \frac{\Delta \rho g d^2}{\sigma} \right)^{-0.35} \dots (4.1)$$

( $d_p$ : droplet diameter,  $d_n$ : nozzle diameter)

この式における括弧内がエトベス数であるが、エトベス数を0.1から10の範囲で振った場合の液滴径とノズル径の比について示したものをFig.4-1-16に示す。

Fig.4-1-16より形成が予測される液滴径のノズル径に対する比が1を超える場合のエトベス数が4であり、より低い $Eo < 4$ の条件においては形成予測される液滴径が管内径よりも大きくなるため、状態を保てず液滴状になりそれ以上の高エトベス数条件では液滴の比が1に満たないため安定して連続した二層流を形成すると考えられる。この比が1となるときのエトベス数を臨界エトベス数 $Eo_c$ と定義する。

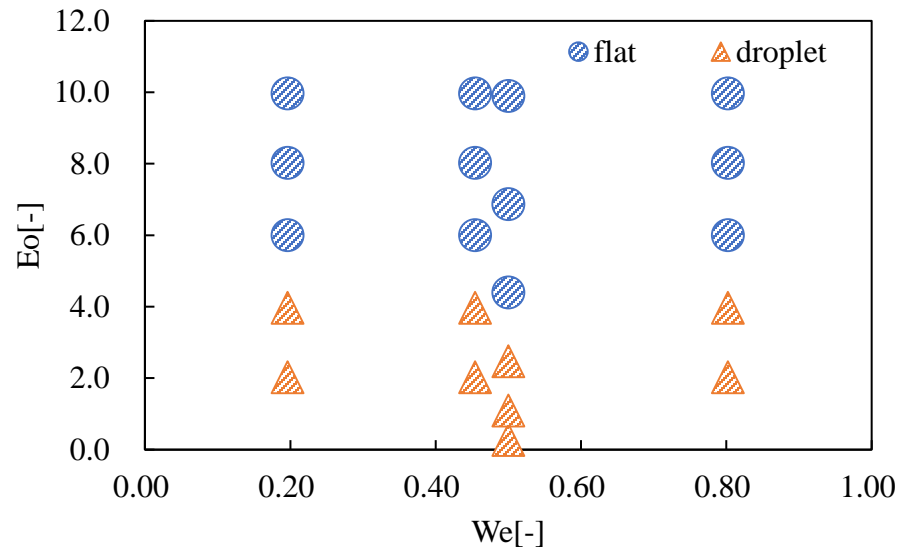


Fig.4-1- 15 relationship of Eotvos number and interface aspect by CFD

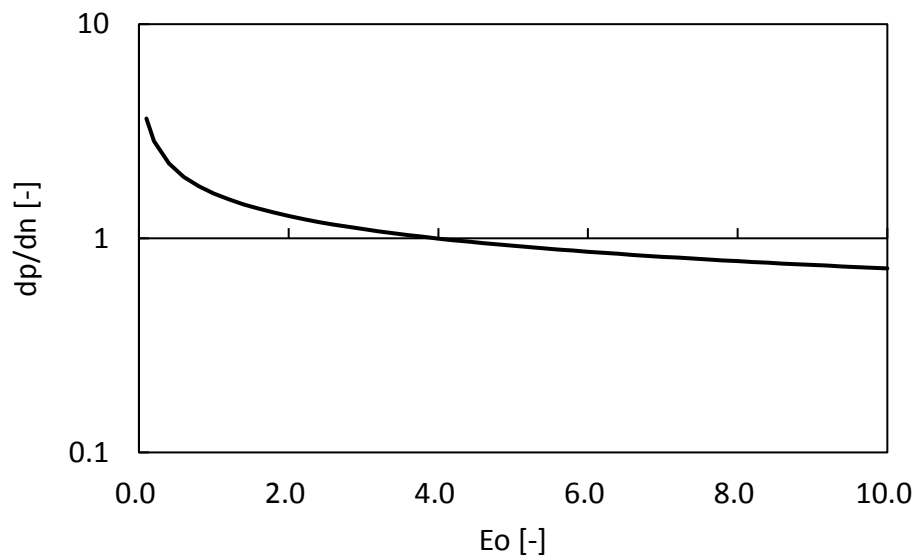


Fig.4-1- 16 Forming droplet diameter ratio by Eotvos number

これを実証するため管内径がこれまで実験で用いた管よりも大きな6mmの円管を用いて界面形成実験を行った。以下にそれぞれの高密度流体における管径ごとのエトベス数を示し、Fig.4-1-17に界面様相を示す。Fig.4-1-17より実験においてもエトベス数が臨界エトベス数よりも大きい高エトベス数域において、ウェーバー数0.05以上の範囲における水平界面の形成が可能であることを示した。これらのことから管内径1mmの管だけでなく、管内径が6mmの管においてもより広い範囲での液液二層流の形成が可能であることを示した。

Table4- 1 Eotvos number of each fluorinert and diameter

管径[mm]	FC-40	FC-3283	FC-72
1	0.21	0.28	0.19
2	0.85	1.10	0.77
4	3.41	4.40	3.08
6	7.68	9.90	6.92

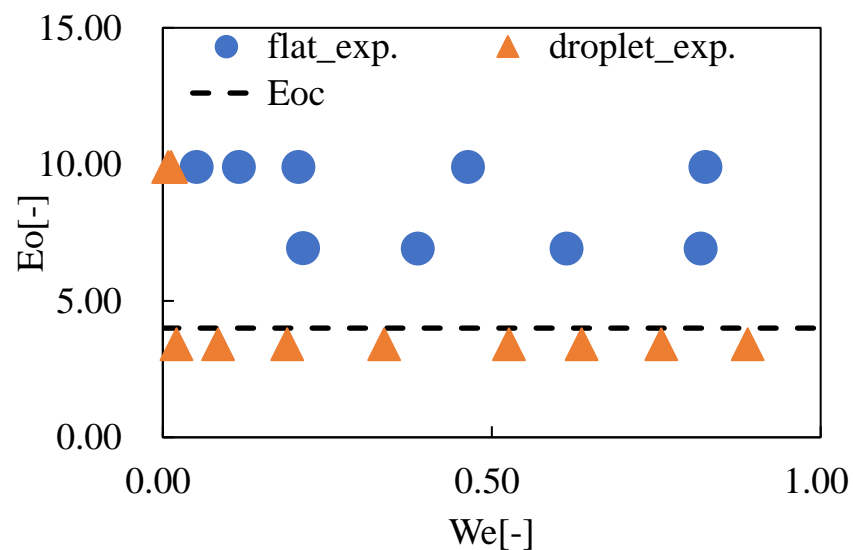


Fig.4-1- 17 Flat interface forming at high Eotvos number

## 4.2 曲り管内界面形成

### 4.2.1 曲り管内液液界面形成実験

Fig.4-2-1 に曲がり管における界面形状の様相とディーン数に関する結果を示す。Fig.4-2-1 より 1mm 管に関しては  $De=20$  付近までは液滴形状の界面であり， $De=20$  において液滴形状と二層流が繰り返すような遷移状態，これより大きい条件において液液二層流の形成を確認した。これは慣性力の影響が界面張力よりも大きくなったためと考えられる。次に 6mm 管ではディーン数が 30 までの条件では液滴界面形状，30 において遷移状態，それ以上で水平界面の形成を示した。

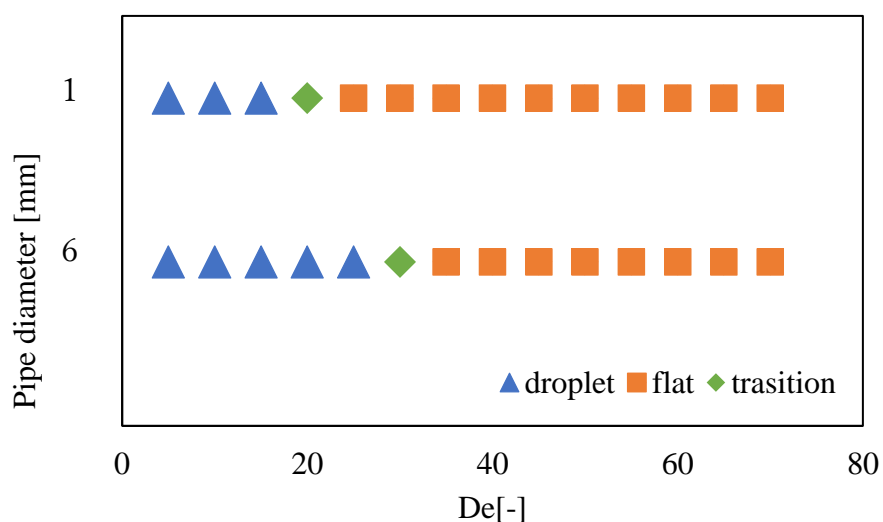


Fig.4-2- 1 Relationship between interface aspects and Dean number at bending pipe

#### 4.2.2 数値流体解析における曲り管内液液界面形成

曲り管内における液液界面の形成について観察領域である出口付近 $\theta = 180^\circ$ における界面様相についての解析結果と曲り管・直管の実験結果を Fig.4-2-2 に示す。Fig.4-2-2 における管内径 1mm 曲り管の解析・実験結果に着目すると、界面の形状が液滴界面から水平状の界面に遷移する条件が実験結果ではディーン数が 20 程度、解析結果ではディーン数が 20 から 30 の間であることからおおそ一致していることが分かる。また直管と曲り管の実験結果について比較すると、直管ではディーン数 15 付近において遷移しているため、曲り管における水平界面の形成条件は直管時よりも高いディーン数に推移することを示した。次に管内径 6mm の結果では解析結果ではディーン数が 10 の場合においても水平界面が形成しており、直管における実験でもディーン数 10 付近での界面形状の遷移が生じている。このことから今回の実験範囲では水平界面の形成条件ディーン数は曲り管と直管で大きく変化しないと予測される。しかしながら曲り管の実験においてディーン数が 30 付近で液滴界面から水平界面へと遷移する結果を示している。これは本実験において使用したガラス製の曲り管の直管部と曲り管部の接合部が水平でなく、水平状の土台上に曲り管部を静置した際に、直管部において傾きを生じていることが原因と考えられる。このように流体の密度差による水平界面の形成はとても広い条件において水平界面を形成可能であるが、静置方法や入り口から出口まで水平な管が必要である。



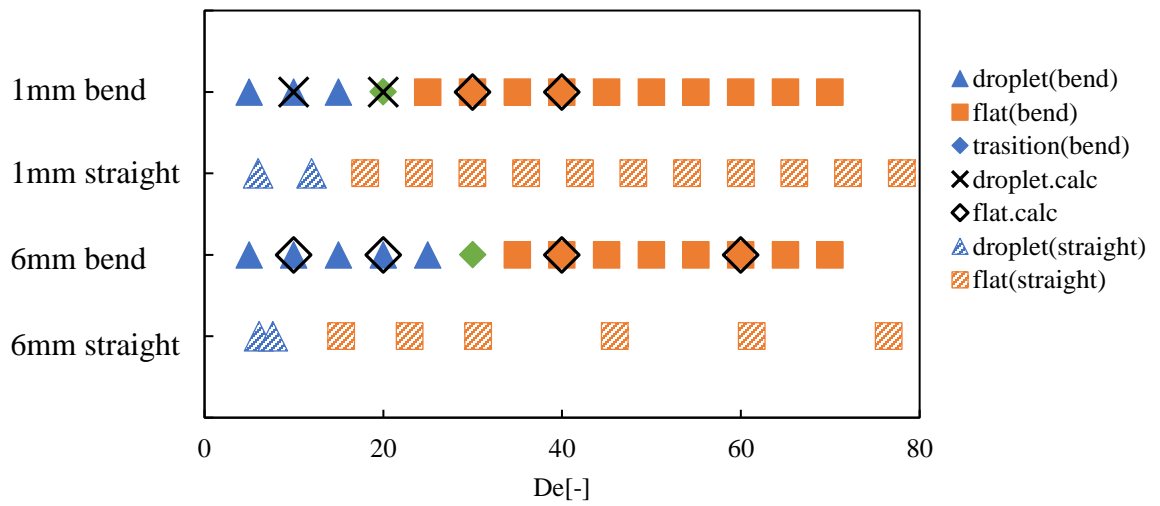


Fig.4-2- 2 Comparison straight and bend pipe, analysis interface aspects

#### 4.2.3 数値流体解析による形成界面の定性評価

曲り管における数値流体解析の計算結果について定性的に評価を行う．Fig.4-2-3 に 6mm 管における解析結果のうち 90 度～180 度までについて Y 軸マイナス方向からみた結果を示す．Fig.4-2-3 より 6mm 管においてディーン数による界面形状の大きな変化は特に見られず，安定した水平界面の形成が確認できる．次に Fig.4-2-4 に 1mm 管における解析結果の直管部・曲り管部の 0 度から 90 度までを Y 軸プラス方向から見た結果を示し，Fig.4-2-5 に Y 軸マイナス方向からみた 90 度から 180 度までの結果を示す．Fig.4-2-4 よりディーン数が 10 の条件では液滴の界面，これがディーン数 20 のときに直管部では水平界面，曲り管に差し掛かった部分において液滴形状などを形成する様子が確認できる．またディーン数 30 と 40 について，30 では Fig.4-2-5 において時間経過と共に流出方向に進行する界面が大きく膨れ上がるように安定した水平界面になっていない形状が確認できる．これは高密度流体が遠心力等により外側や内側にぶれるような様相であり，曲り管によって形成される界面であると考察できる．このような界面形状は Fig.4-2-6 に示すように液滴界面から水平界面に遷移するような条件における実験においても確認されている．これより大きな流速による水平界面形成されたディーン数 40 においては界面のぶれもすくなく安定した二層流の形成が確認できている．

以上のように不安定な形状も確認される条件が存在したが，直管と同様低いディーン数において水平界面を形成できることを示した．それゆえに次節からの粒子選別実験においてより低いディーン数での実験のため管内径 1mm，6mm の曲り管を使用し，検討を行う．



Fig.4-2- 3 Interface shape by CFD at 6mm



Fig.4-2- 4 Interface aspects and shape by CFD at 1mm ( $0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$ )

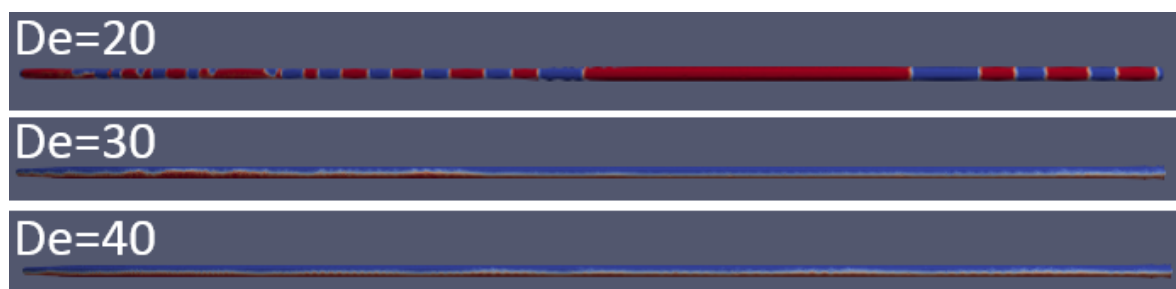


Fig.4-2- 5 Interface aspects and shape by CFD at 1mm ( $90^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$ )

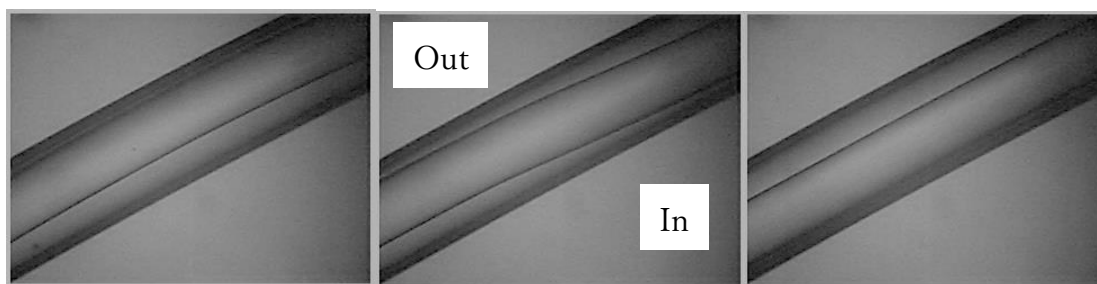


Fig.4-2- 6 Vibration of high density fluid

### 4.3 細胞模擬粒子実験結果

#### 4.3.1 密度差粒子選別実験結果

実験により観察された粒子分布について、密度の大きい多分散メラミン粒子のディーン数 50, 70, 95, 110 における観察領域を通過した粒子の粒子分布を Fig.4-3-1, Fig.4-3-2 に示す。本結果は管内径 4mm におけるものである。Fig.4-3-1,2 において粒子分布はディーン数がおおきくなるにつれて外側に偏在する様子が確認できる。これは粒子がディーン流れによって外側に動かされていくことによると考えられる。一方密度の比較的小さな生細胞塊模擬粒子のディーン数 40, 60, 80, 100 における観察粒子を通過した粒子の粒子分布を Fig.4-3-3, Fig.4-3-4 に示す。Fig.4-3-3, 4 においてディーン数 40 において粒子は外側に偏在しているが、それ以上大きなディーン数において粒子分布は一様に近い分布を示した。これらの粒子分布について外側に偏在した粒子の量について整理した外側 2 割を通過した粒子の割合である粒子分離率とディーン数の関係を Fig.4-3-5 に示す。Fig.4-3-5 においてそれぞれの粒子について粒子分離率は臨界ディーン数となるピークを有しており、多分散メラミン粒子ではディーン数 100, 生細胞塊模擬粒子では 40 程度を示し、それぞれの粒子について臨界ディーン数を計測した。これらのことから粒子密度が変化した際に臨界ディーン数が増加することを示した、流路外側における粒子・細胞分離を考えた場合、ディーン数を特定の値に設定し粒子研濁液と高密度流体の 2 液を流すことで特定の粒子を選別が可能であることを示した。

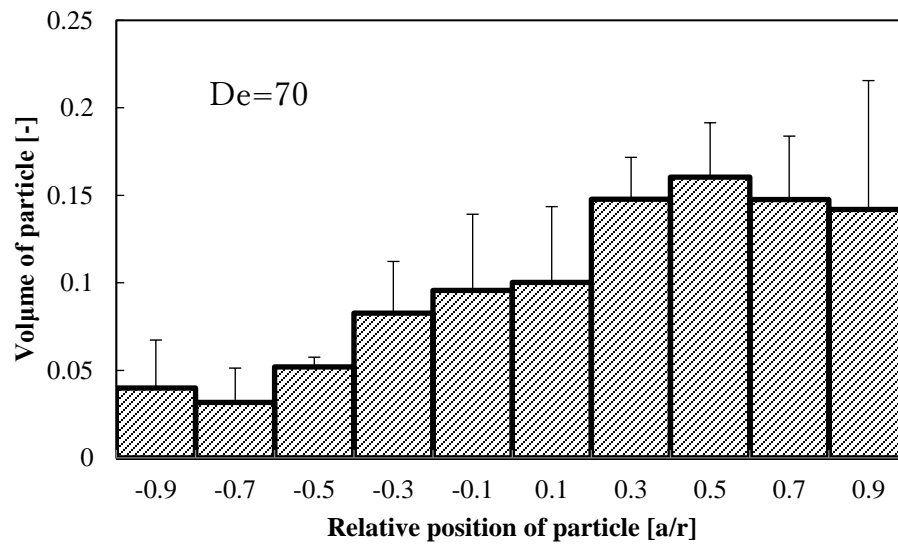
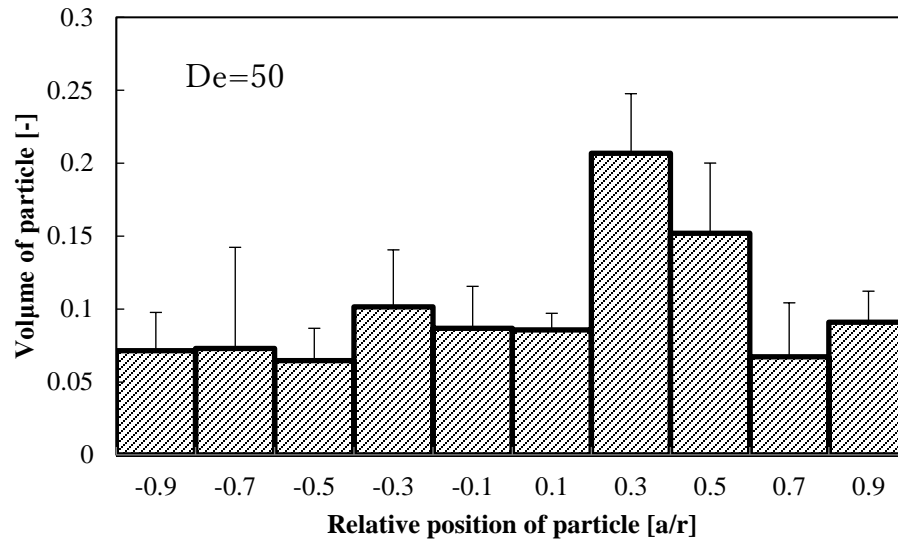


Fig.4-3- 1 Particle distribution of melamine particle (De=50,70)

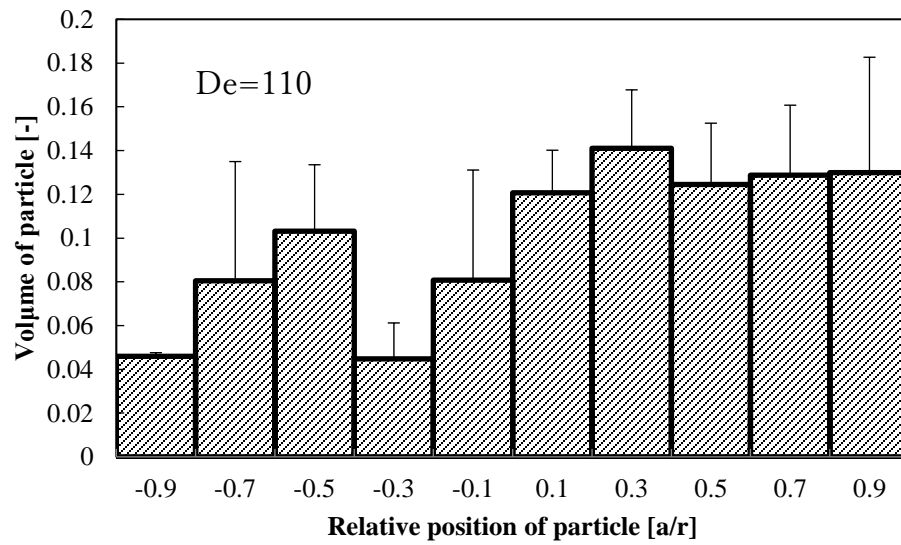
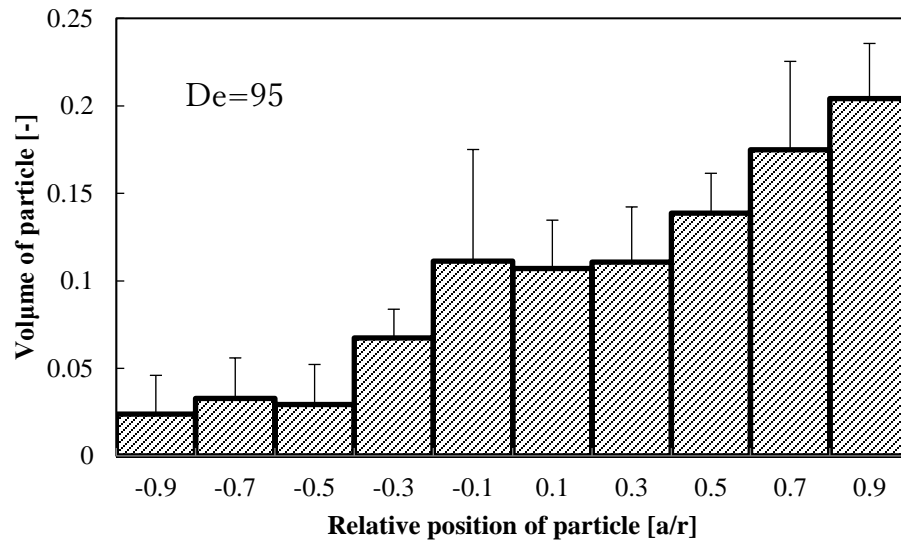


Fig.4-3- 2 Particle distribution of melamine particle (De=95,110)

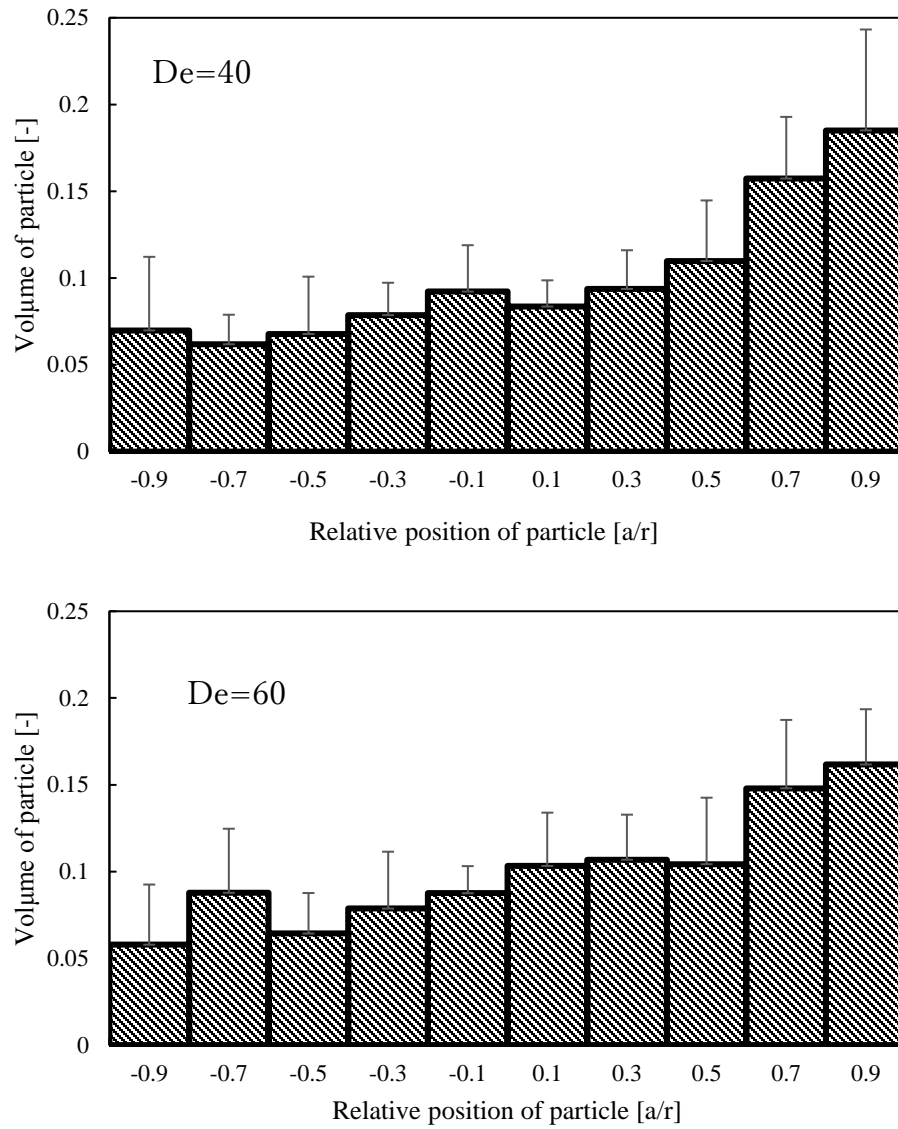


Fig.4-3- 3 Particle distribution of cluster simulated particle ( $De=40,60$ )



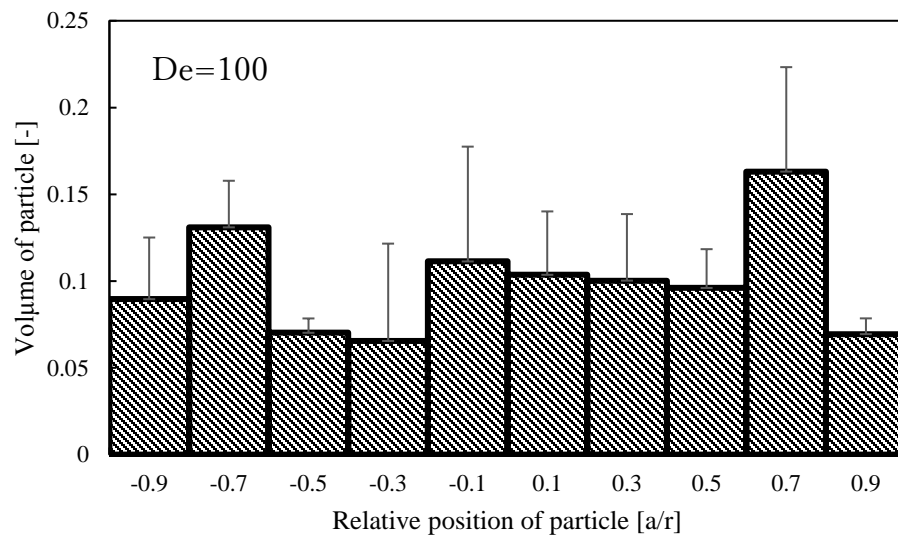
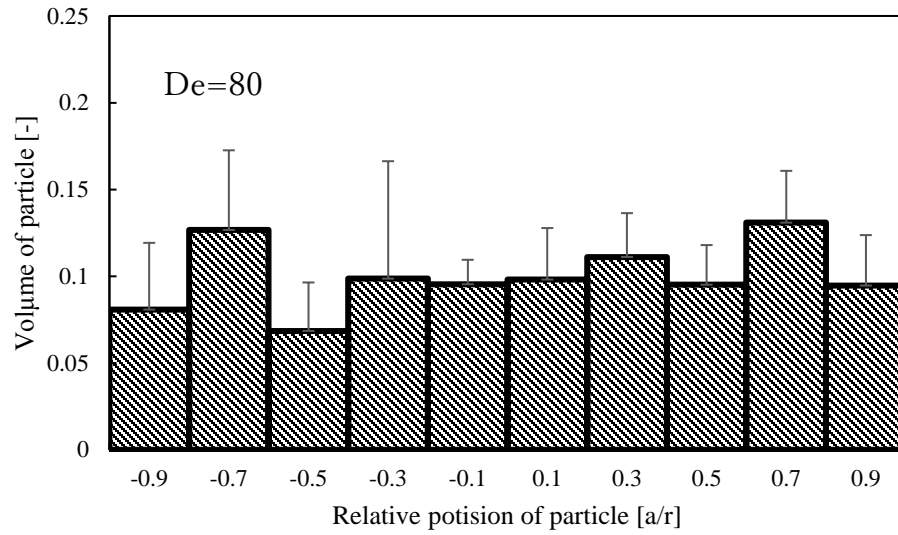


Fig.4-3- 4 Particle distribution of cluster simulated particle (De=80,100)

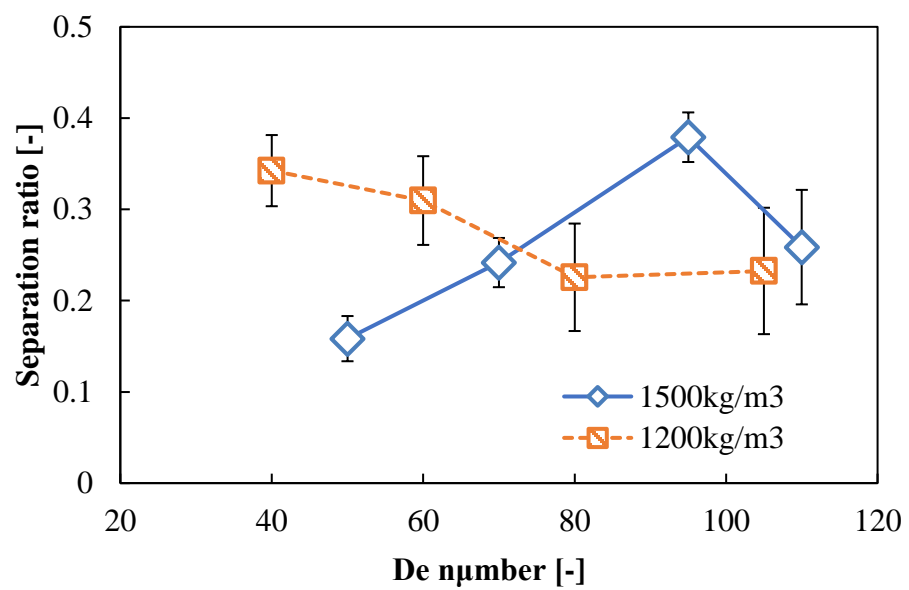


Fig.4-3- 5 Separation ratio of density difference particle

#### 4.3.2 粒径差粒子選別実験結果

次に密度  $1200\text{kg/m}^3$  の粒径  $30\mu\text{m}$ ,  $70\mu\text{m}$  の生細胞塊模擬粒子, 生単離細胞模擬粒子について粒子分布を観察した. 前節において生細胞塊模擬粒子の臨界ディーン数は 40 であったことと,  $4\text{mm}$  管においてディーン数 40 が水平界面の形成条件であり, 液滴界面への遷移もたまに見られるような条件であることから, より低いディーン数においても水平界面が形成可能である管内径  $6\text{mm}$  の曲り管を用いて粒子分布の観察を行った. Fig.4-3-6, Fig.4-3-7 に生細胞塊模擬粒子におけるディーン数が 30, 40, 50, 56, 80, 100 の通過粒子分布を示した. Fig.4-3-6,7 においてディーン数が 40~56 の条件において, 管内粒子の外側への偏在が見られた. それ以外のディーン数に関してはディーン数 30 においては内側への軽い偏在, ディーン数 80, 100 においては一様な分布が確認できる. 一方生単離細胞模擬粒子の管内通過粒子分布についてディーン数 30, 40, 50, 60, 80 における結果を Fig.3-4-8, Fig.3-4-9 示す. Fig.3-4-8,9 において管内粒子はディーン数 60 程度までは一様に分布し, ディーン数 80 において軽く中央への偏在が確認できる. またこれらの粒子における粒子分離率とディーン数の関係を Fig.3-4-10 に示す. Fig.3-4-10 より生細胞塊模擬粒子は少し広い範囲であるが, ディーン数 40~60 付近に偏在が最大となる臨界ディーン数を有し, 一方生単離細胞模擬粒子についてエラーバーが少し大きいこともあるが, 今回計測した範囲内において粒子分離率が極大となるようなディーン数は観察されなかった. これらのことから特定のディーン数において二流体を送液した際生細胞塊模擬粒子のみの選別可能性を示した.

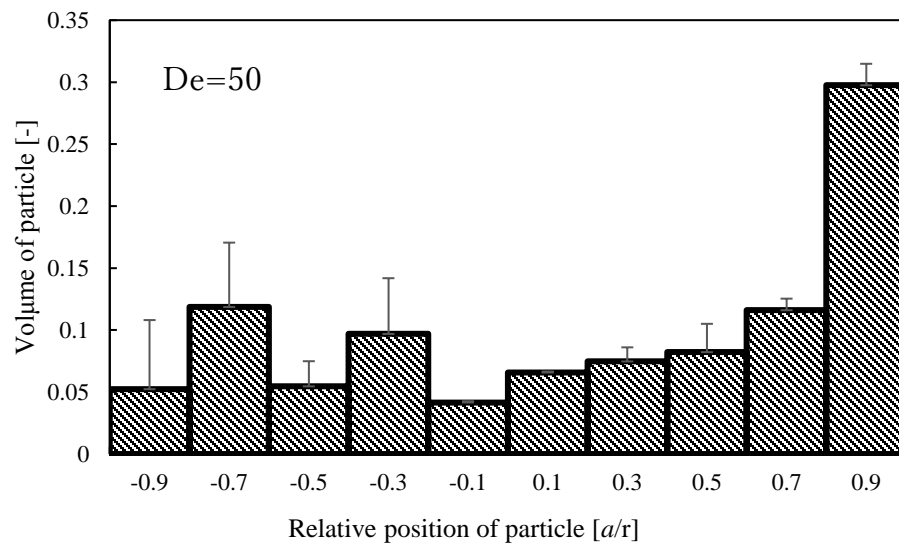
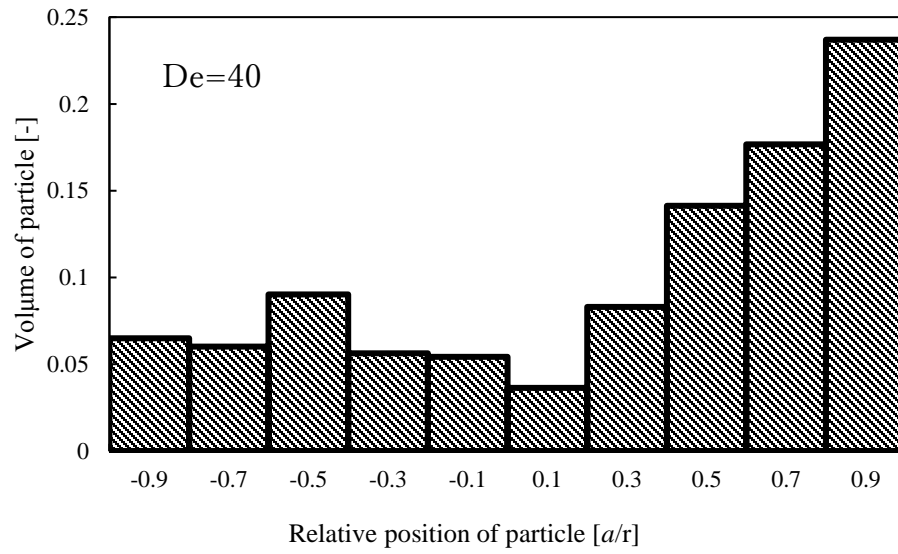
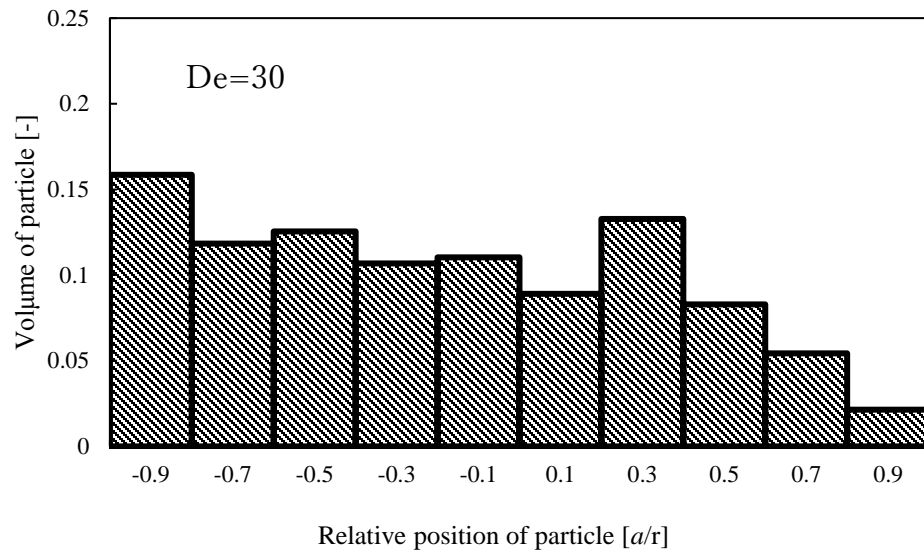


Fig.4-3- 6 Particle distribution of cluster simulated particle (De=30,40,50)

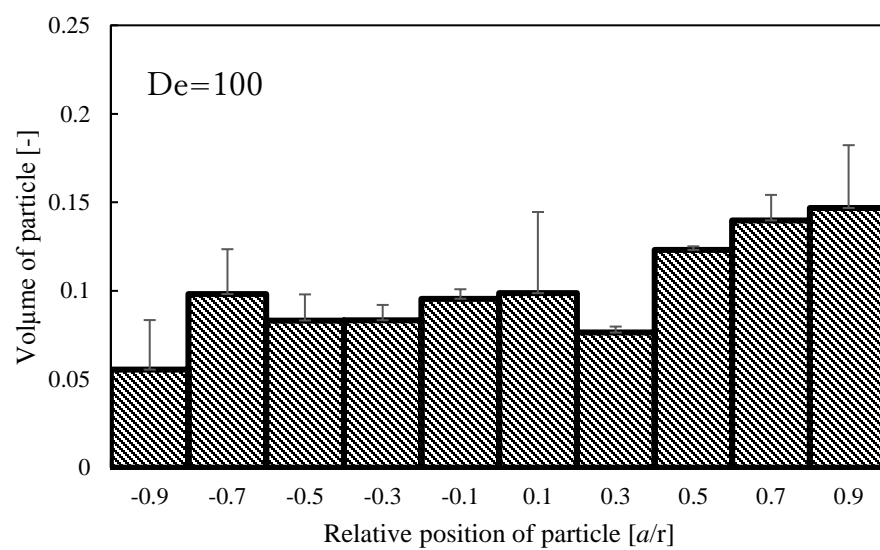
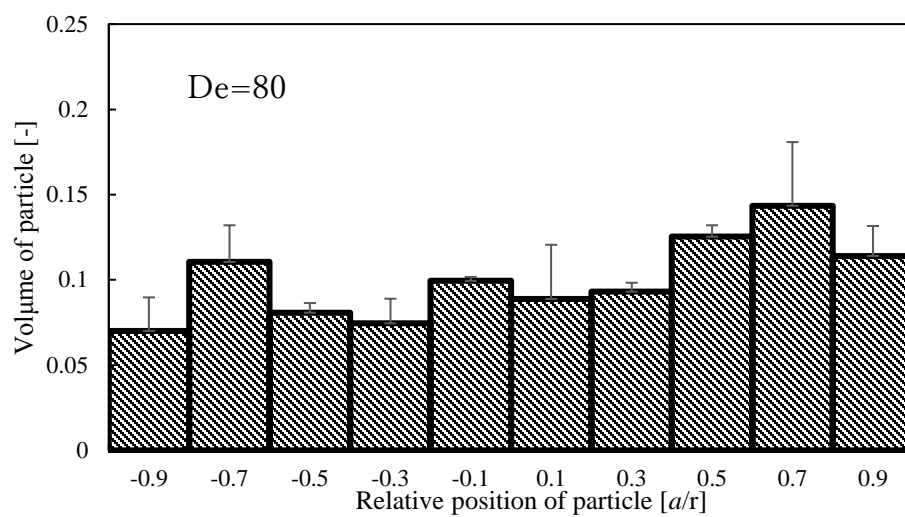
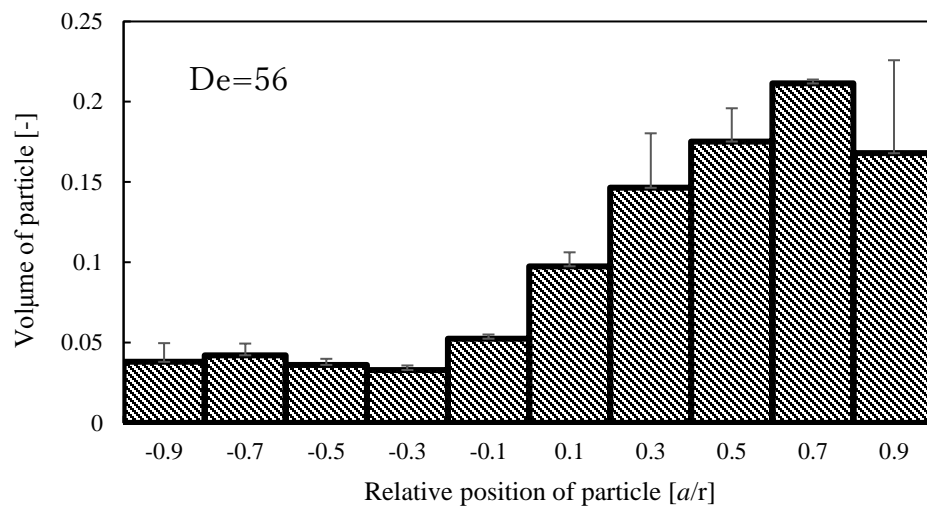


Fig.4-3- 7 Particle distribution of cluster simulated particle (De=56,80,100)

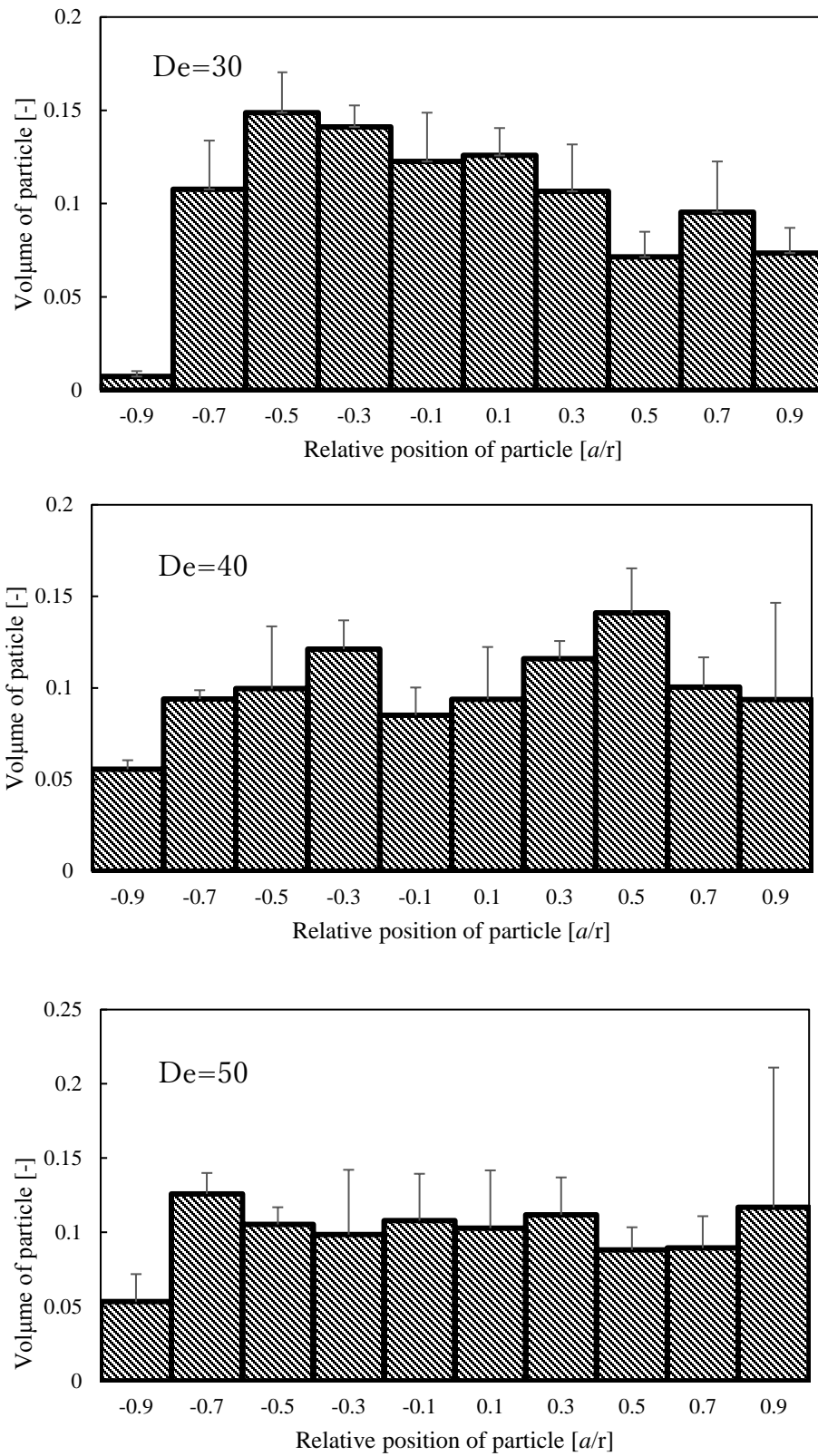


Fig.4-3- 8 Particle distribution of a cell simulated particle (De=30,40,50)

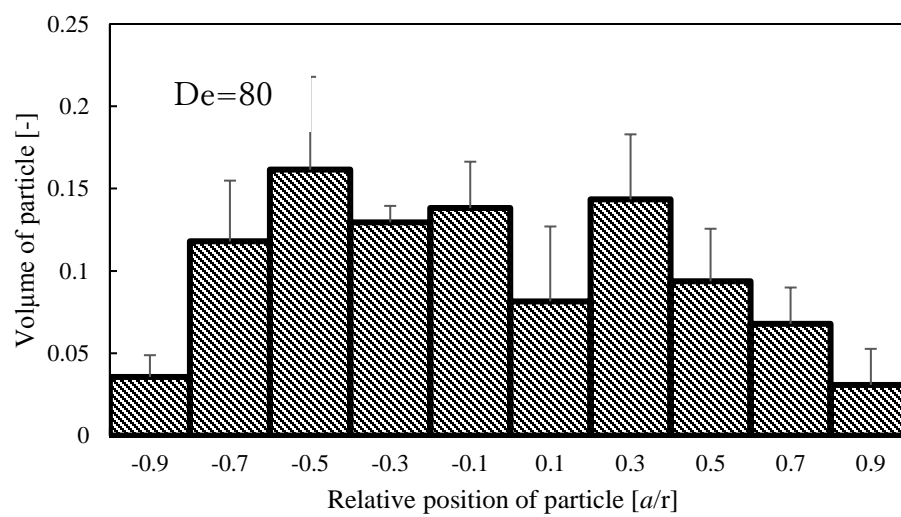
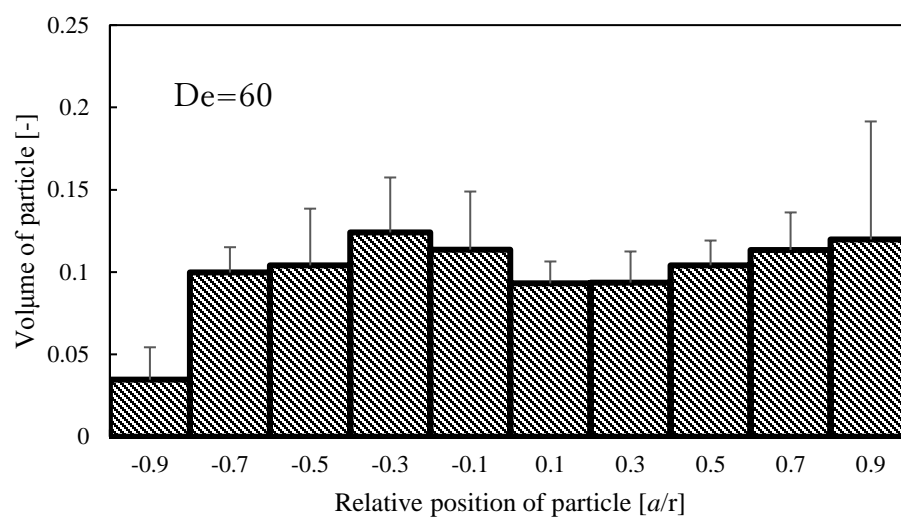


Fig.4-3- 9 Particle distribution of a cell simulated particle (De=60,80)

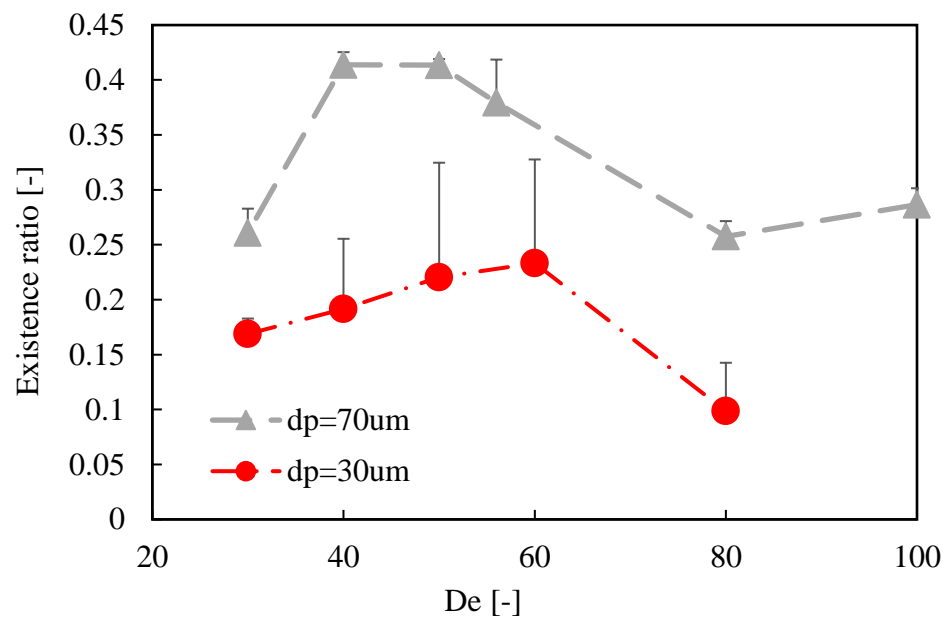


Fig.4-3- 10 Existence ratio of diameter difference particles



### 4.3.3 管径変化における粒子選別特性変化

管内径を比較した際の考察を行うために、粒子密度変化実験と粒子径変化実験において用いた同一粒子についての比較、またそれぞれの粒子の臨界ディーン数について Fig.4-3-11 に示す。Fig.4-3-11 において生細胞塊模擬粒子の管内径 4mm の時、臨界ディーン数は 40 かそれ以下であることが分かるが、管内径 6mm における臨界ディーン数は 40 強から 60 弱の範囲である。中央値である 50 を 6mm 管における臨界ディーン数と仮定すると臨界ディーン数の位置は管内径が大きくなった際に大きくなると考察できる。これは管内径が異なる管においてディーン数が同値の場合の管内二次流れは管内径が小さい管において大きくなることに依存し、同様の管内二次流れ上向き方向を示すために、管内径が大きい場合に臨界ディーン数は大きい値を示すと考えられる。これについて次節における数値流体解析による結果と比較することで考察を行う。

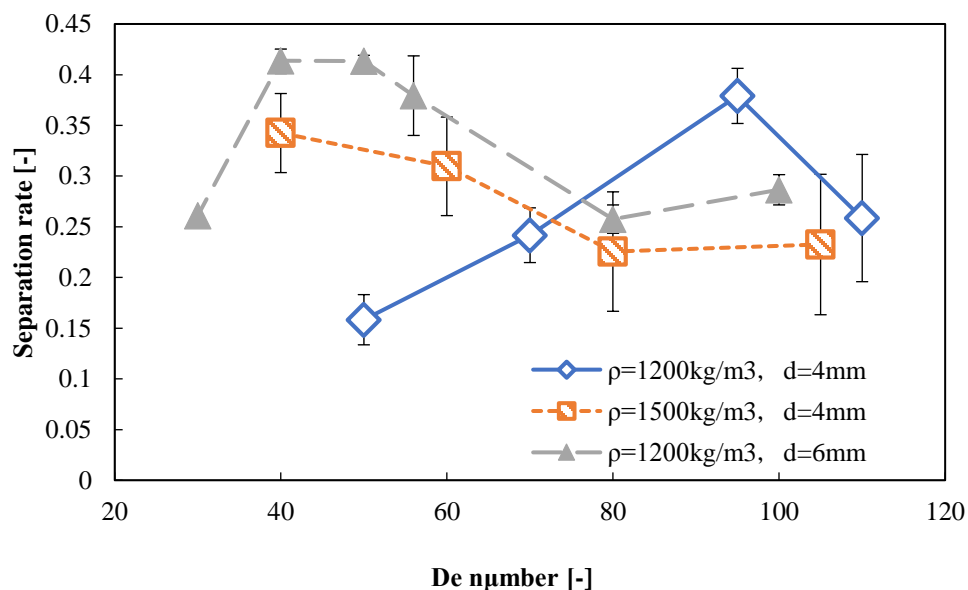


Fig.4-3- 11 Comparison critical De number of several particles

次に管内径を 1mm と前節までよりも小さい径において生単離細胞模擬粒子と生細胞塊模擬粒子の粒子研濁液を送液した際の観察領域における通過粒子分布を示す．生単離細胞模擬粒子のディーン数 30, 40, 50 における粒子分布を Fig.4-3-12 に示し，生細胞塊模擬粒子のディーン数 30, 40, 50, 60, 80 の粒子分布を Fig.4-3-13 と Fig.4-3-14 に示す．Fig.4-3-12 においてディーン数 40 において相対管内径位置-0.5 の位置においてエラーバーが大きくなっているが，この点を除いて本条件における生単離細胞模擬粒子は相対粒子位置 0.1-0.5 の管内中心より少し外側の位置に偏在していることが分かる．一方 Fig.4-3-13,14 における生細胞塊模擬粒子の粒子分布について，ディーン数 30 において粒子は一様に分布し，40 において外側に偏在し，ディーン数 50 において内側への偏在が見られた．またディーン数 60 において中心付近での偏在が見られ，ディーン数が大きい 80 の条件において管内壁面付近である内側と外側での偏在を確認できた．これらのことから生細胞塊模擬粒子についてはディーン数 60 以外の条件において壁面近傍である外側もしくは内側に偏在を確認できた．またディーン数においてそれぞれ粒子の偏在位置が異なることについて粒径が大きい生細胞塊模擬粒子においてもディーン流れによる流体抗力が働いており，管内粒子が偏在しやすい位置を移動していることが考えられる．粒子に加わる流体からの力についても次節以降の数値流体解析を含めて考察していく．

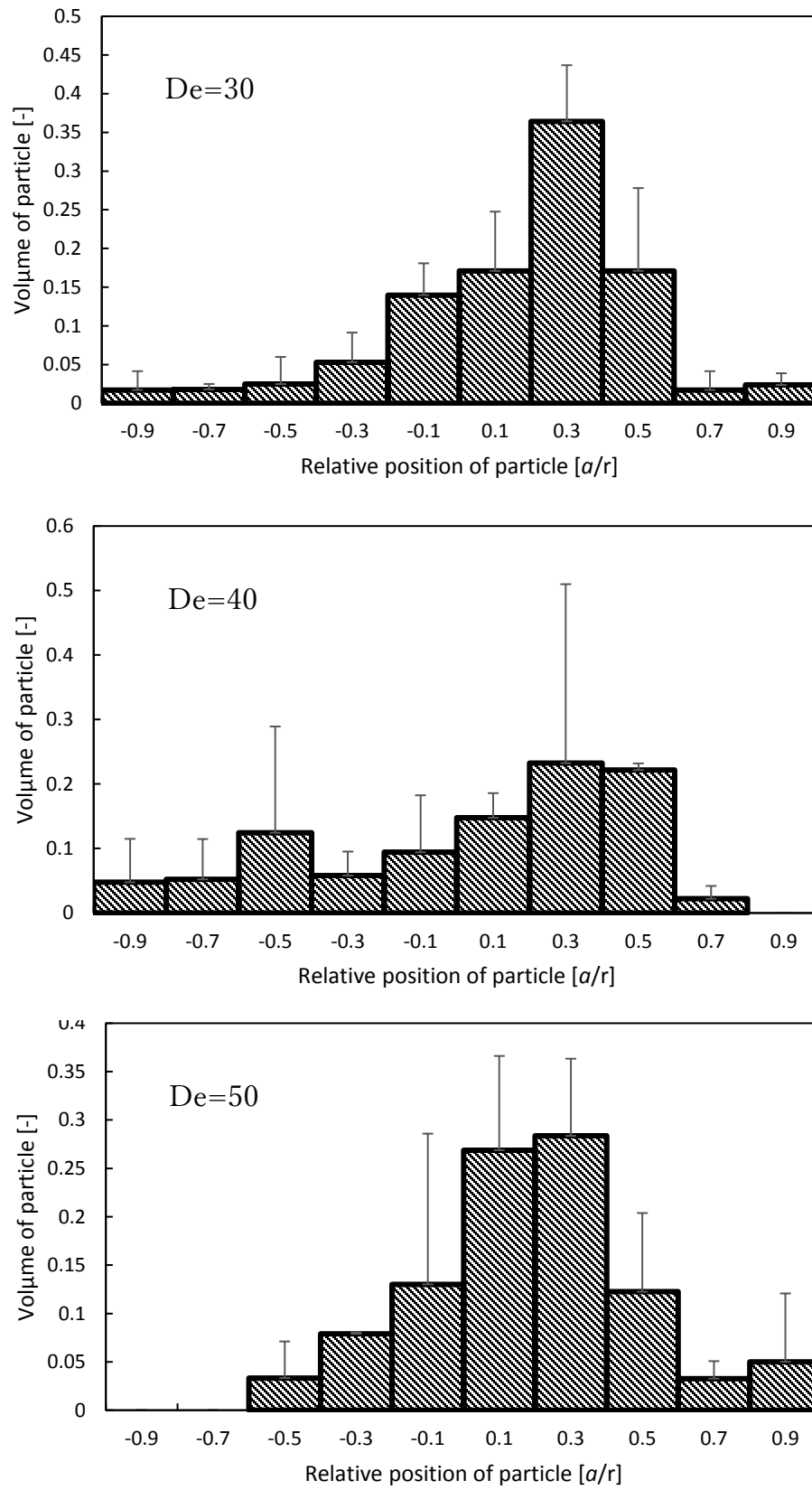


Fig.4-3- 12 Particle distribution of a cell simulated particle at 1mm pipe (De=30,40,50)

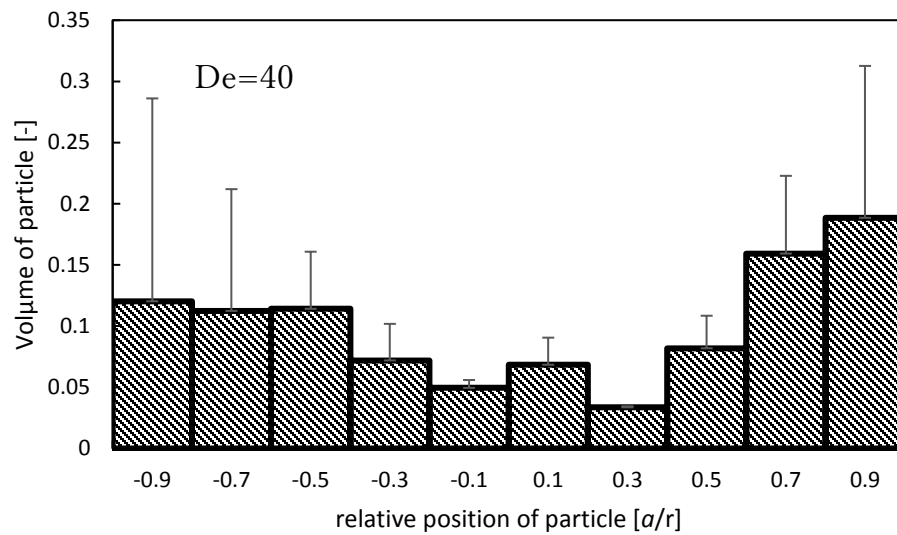
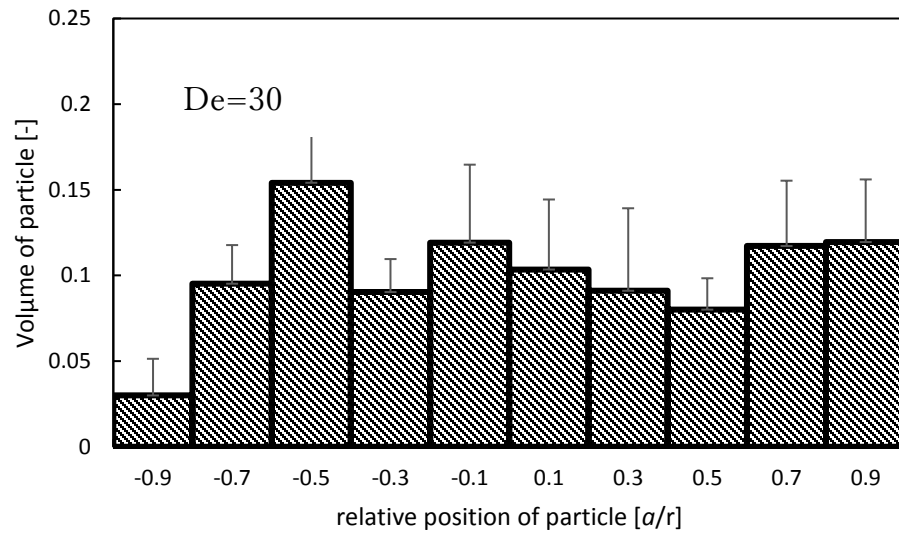


Fig.4-3- 13 Particle distribution of cluster simulated particle at 1mm pipe (De=30,40)

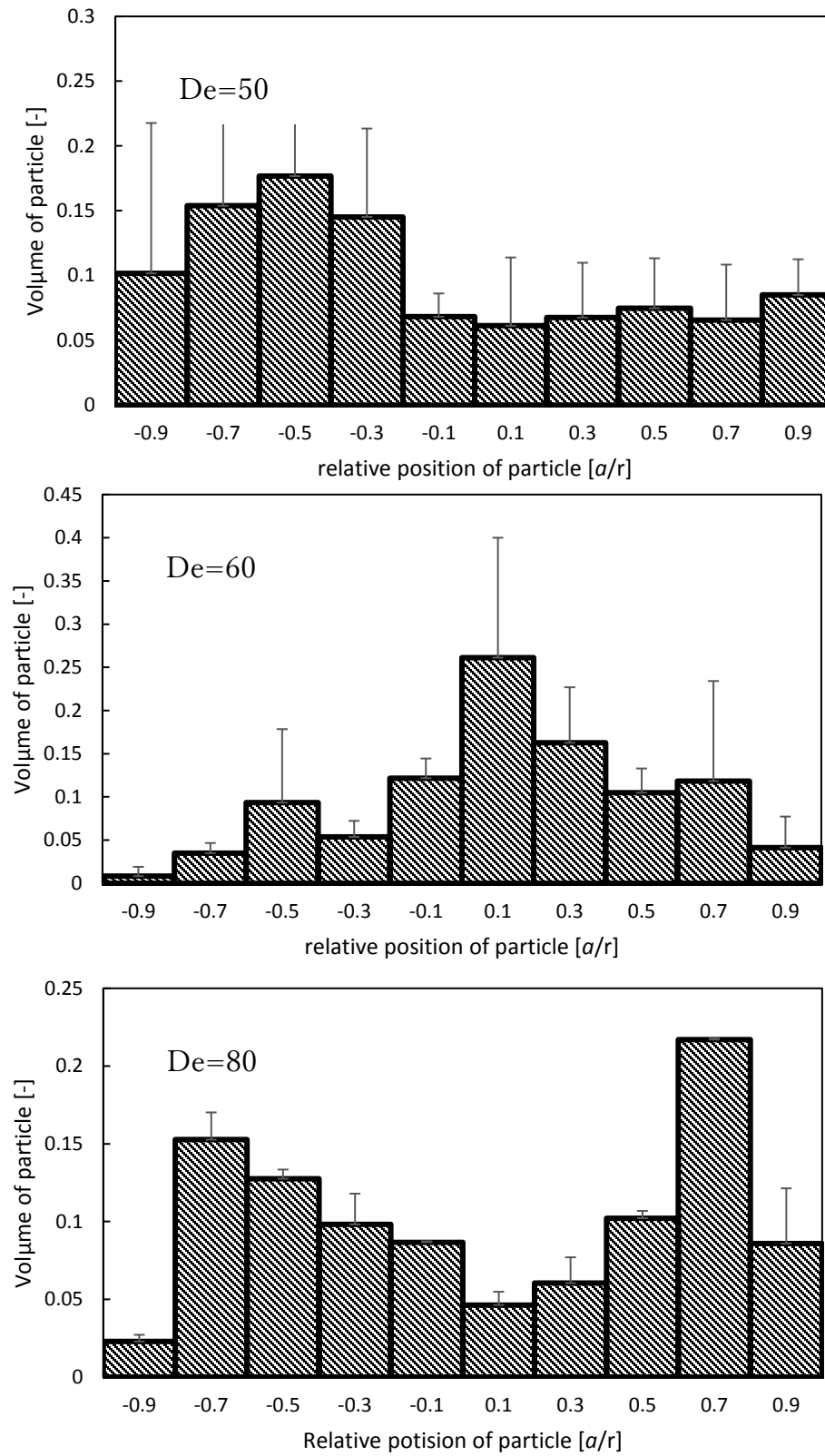


Fig.4-3- 14 Particle distribution of a cell simulated particle at 1mm pipe (De=50,60,80)

#### 4.3.4 数値流体解析における管内流体・粒子挙動

数値流体解析によって得られた流速分布より見積もられる粒子に働く力を計算し、実験結果との比較を行う。数値流体解析による主流方向速度分布についてディーン数 40 での 1mm 管、4mm 管、6mm 管の結果を Fig.4-3-15 に示す。Fig.4-3-15 においてそれぞれの管における主流速度の偏在が同程度であること、またおおよそ同形状の流線について、1mm 管よりも管内径が大きい管においてより内側外側まで流れるような大きな渦を描いていることが確認できた。これは流体抗力のみが粒子に働いたとした場合により外側まで粒子を運搬する可能性を示しており、管内径の大きい管がより壁面近傍における細胞選別に向いている可能性を提示することが出来る。この解析結果より算出した各方向成分の流体速度より、比重 1.2、粒径  $30\mu\text{m}$  の生単離細胞仮想粒子と同密度粒径  $70\mu\text{m}$  の生細胞塊仮想粒子に働く、流体抗力・遠心力・揚力を算出し、合力をベクトル図として示すことで定性的な評価を行う。まず管内径 4mm 管におけるディーン数 20, 40, 60 の時の粒子が受ける力を生単離細胞仮想粒子について Fig.4-3-16, 生細胞塊仮想粒子について Fig.4-3-17 に示す。また同様に 6mm の管における粒子が受ける力を Fig.4-3-18, Fig.4-3-19 に示し、1mm 管における粒子が受ける力を Fig.4-3-20, Fig.4-3-21 に示す。Fig.4-3-16,17 において管外側の境界層付近のベクトルについて着目すると生単離細胞仮想粒子についてはディーン数が 20 のときも外側もしくは上側を向いていること、ディーン数が大きい場合にも同様のベクトルを有していることからディーン流れによる流体抗力の影響が大きいことが分かる。一方生細胞塊仮想粒子についてディーン数が 20 の時には外側壁面近傍のベクトルが下を向いていることが観察できる。これはディーン流れによる流体抗力よりも粒子に働く重力が大きく粒子の沈降を促す方向に力が働いていると考察できる。またディーン数が 40 になった際には壁面近傍のベクトルが上側を向いていることから流体抗力が重力よりも大きくなったことが考察可能である。このため管内径 4mm における生細胞塊仮想粒子の臨界ディーン数は  $20 \leq \text{De}_c \leq 40$  の範囲に存在することが考えられ、これは実験による結果と同様であ

る．また実験において不可能な条件下ではあるが，管内径 4mm の管を用いて  $20 \leq De \leq 40$  の範囲で水平界面である液液二層流の形成が可能であれば粒子の選別可能性が存在する．次に管内径 6mm の管において粒子へ働く力を考察する．Fig.4-3-18,19 において管内径 4mm の管のベクトル図と近い図が得られた．生単離細胞仮想粒子は壁面近傍においてディーン数 20 では下向きベクトル，ディーン数 40, 60 において上向きのベクトルが観察できる．また生細胞塊仮想粒子の壁面近傍についてディーン数 20 では下向きベクトル，40 では自重によりある一定の高さ以下の粒子においては中心部から上昇せずに外側に水平に力が働き，外側の下向きベクトルが存在する位置まで運ばれるような想定が可能である．60 においては壁面近傍のある高さまでは下向きのベクトル，それ以上において上向きのベクトルを有しており，ある一定の高さ以下に存在する粒子の選別可能性を示している．これらのことから管内径 6mm の管における生細胞塊仮想粒子の臨界ディーン数は  $40 \leq De_c \leq 60$  の範囲内に存在することが想定され，これは実験値と同様である．次に Fig.4-3-20,21 における管内径 1mm の管内での粒子に働く力について考察を行う．Fig.4-3-20 において一部ベクトルの欠損や境界層が見られない問題が存在するが，ディーン数 20, 40, 60 の全ての範囲において粒子がディーン流れによる流体抗力に追従するような挙動を確認することが出来る．このように粒子がディーン流れに乗ることにより粒子は管上面に存在する渦の近くにおいて安定し，実験で得られたような中心に偏在する粒子分布となったと考えられる．また Fig.4-3-21 における生細胞塊仮想粒子についてこれまでのベクトル図とは異なり，ディーン数 20, 40, 60 どの条件においても中心から外側へ向かうような力が粒子に加わることが観察できる．これは粒子径が管内径に対して大きく，流体の主流速度によって作られる速度勾配からより安定した位置に移動しようとする揚力が大きく働いているためである．この力によりそれぞれのディーン数において管内外側壁面近傍でのベクトルの集中や，管内内側壁面でのベクトルの集中が確認できる．このベクトルの集中により実験において生細胞塊模擬粒子の管内中央以外への偏在が起こったと考察できる．揚力において壁面か

ら一定の距離の位置に粒子の偏在が考えられるが、微力ながら存在するディーン流れによって管内内側への粒子の集中を予測することが出来る。また実験により観察された内側への粒子の偏在(ディーン数 50)はこれによるものと考えられる。今回は計算の簡易化のため揚力が管内中心から外側へ向かうよう計算したが、本来は主流流速の最大箇所である中心より少し外側の位置から壁面に向かって揚力が働くと考えられるため、より外側に偏在している粒子が壁面をなぞり内側もしくは管上側壁面に偏在する可能性も考えられる。これらのことから管内径が 1mm の管を用いることにより特定のサイズの粒子を管内外側もしくは内側に偏在させることが可能である。



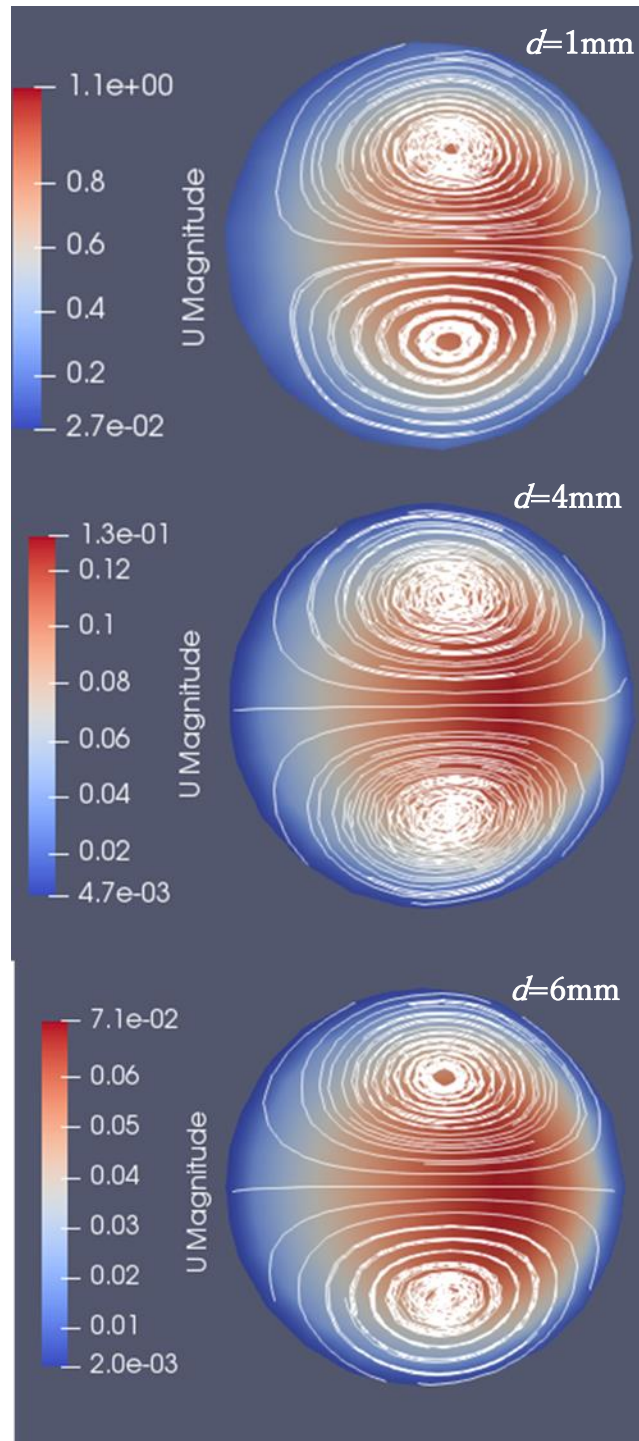
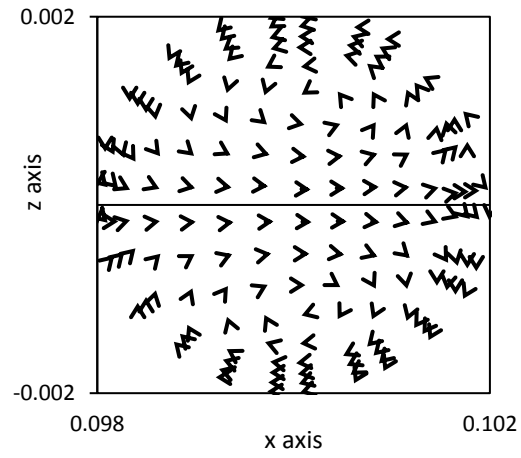
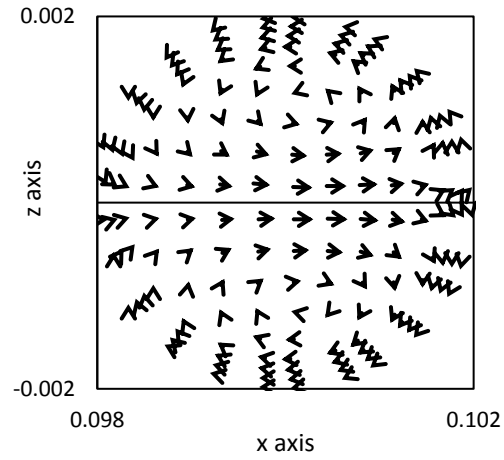


Fig.4-3- 15 Main velocity of a fluid CFD ( $De=40$ )

De=20



De=40



De=60

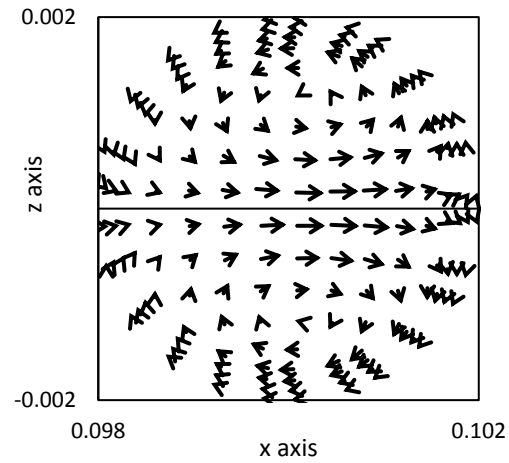
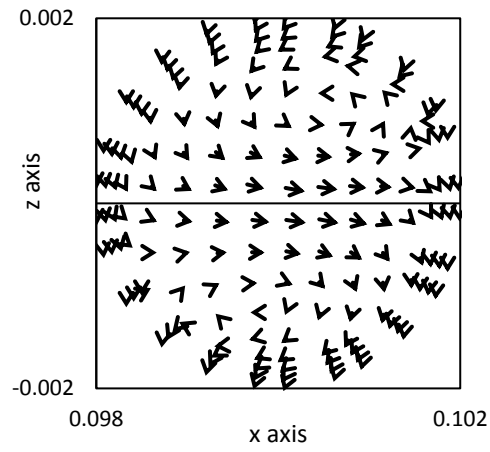
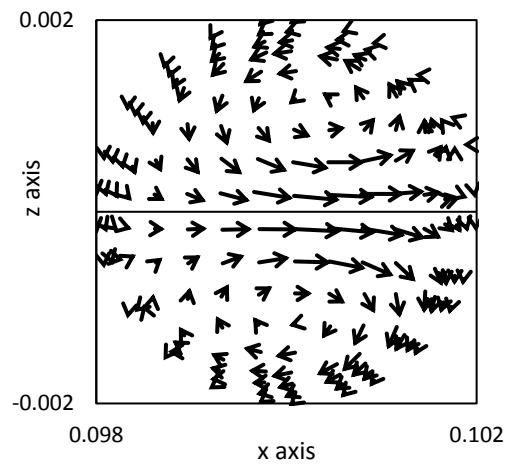


Fig.4-3- 16 Force vectors to 30 $\mu$ m particles at 4mm pipe

De=20



De=40



De=60

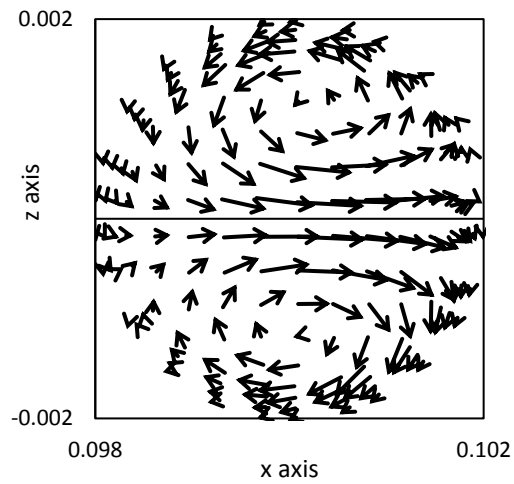
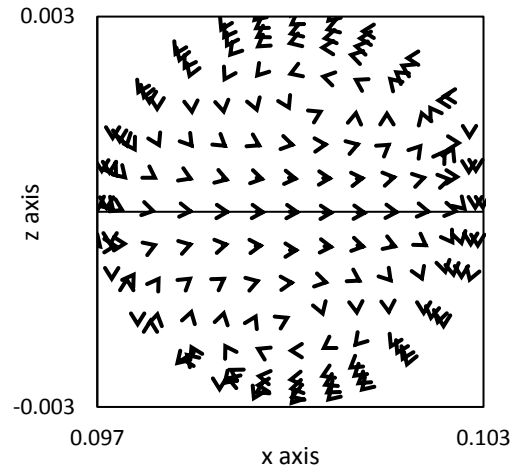
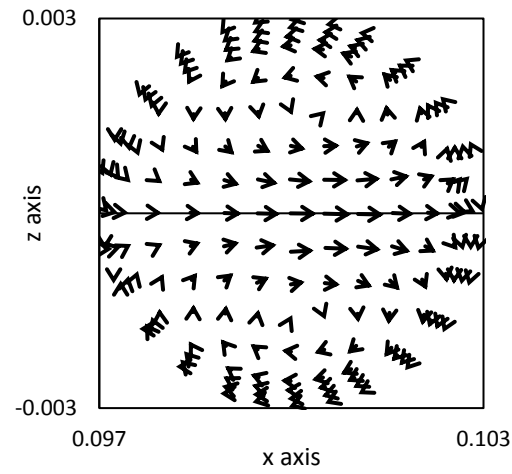


Fig.4-3- 17 Force vectors to 70 $\mu$ m particles at 4mm pipe

De=20



De=40



De=60

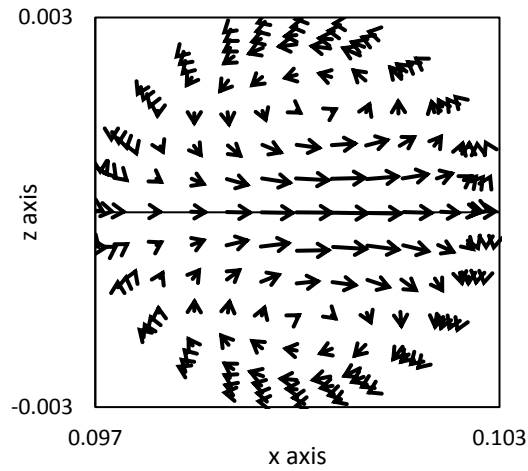
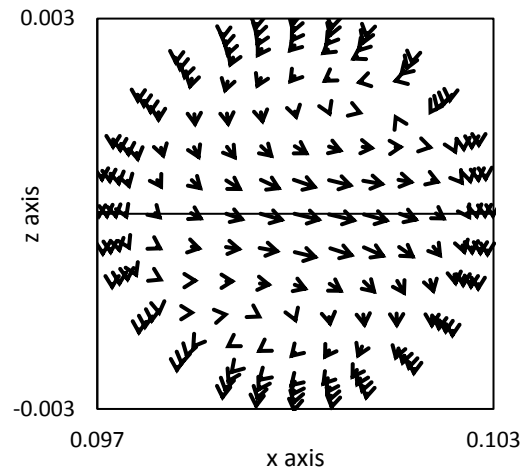
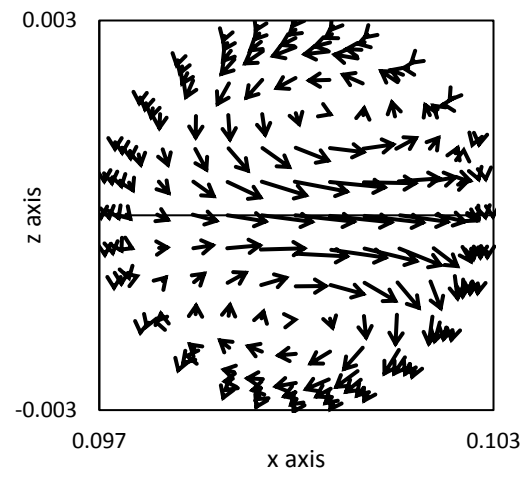


Fig.4-3- 18 Force vectors to 30 $\mu$ m particles at 6mm pipe

De=20



De=40



De=60

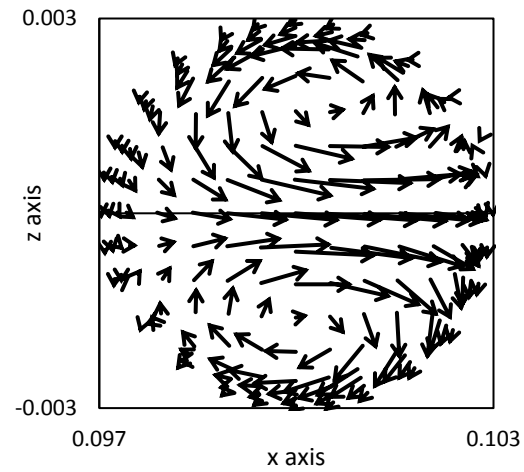


Fig.4-3- 19 Force vectors to 70 $\mu$ m particles at 6mm pipe

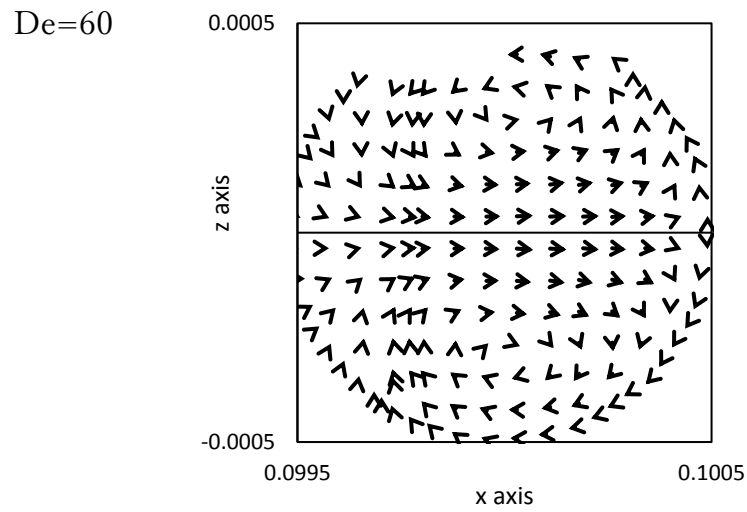
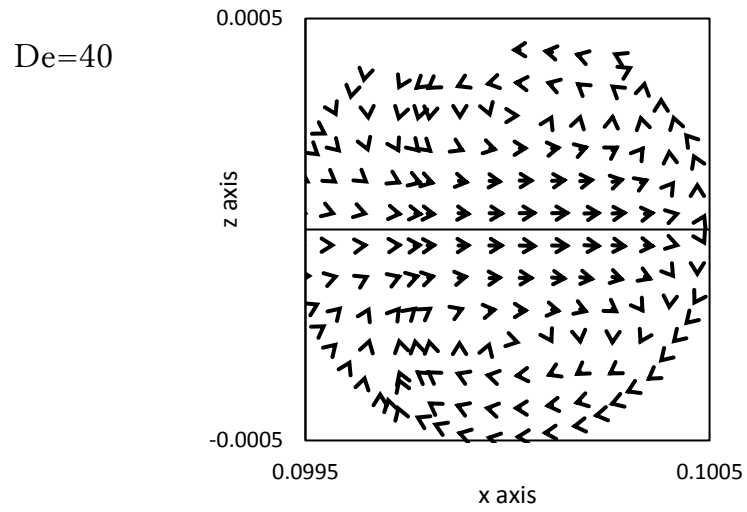
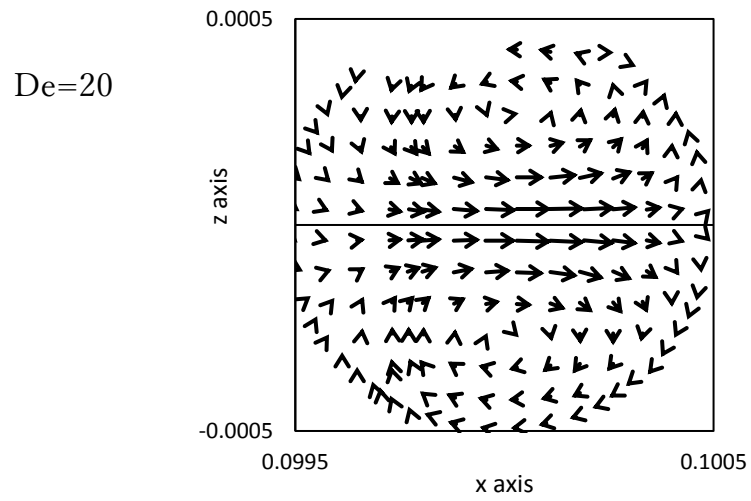


Fig.4-3- 20 Force vectors to 30 $\mu$ m particles at 1mm pipe

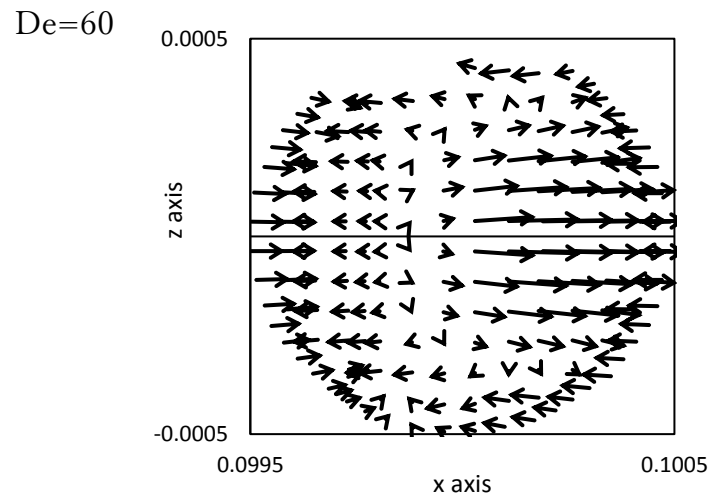
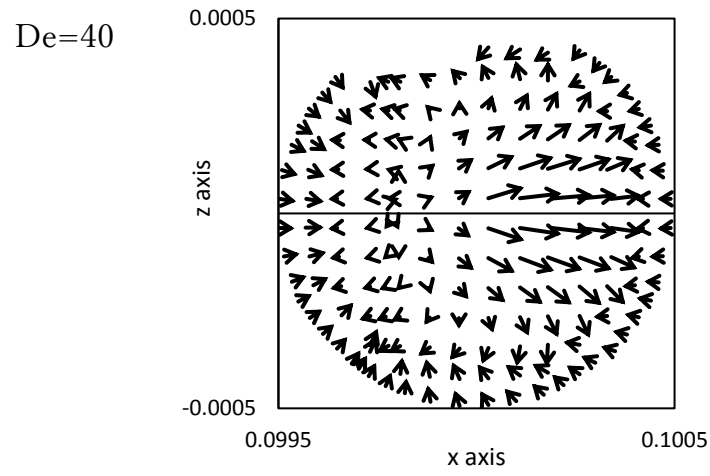
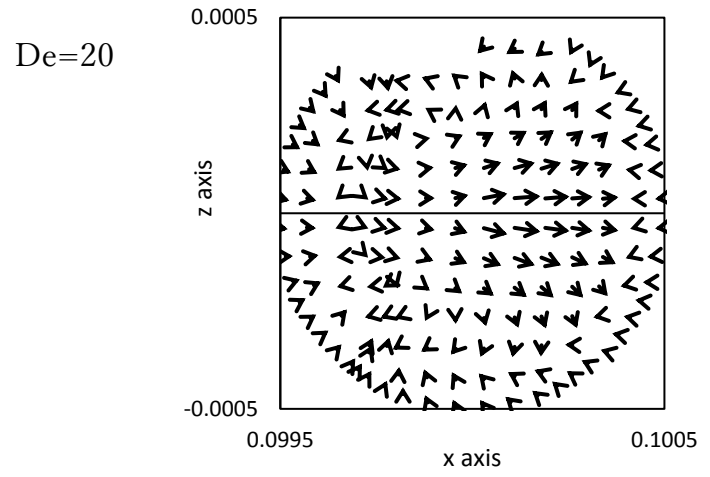


Fig.4-3- 21 Force vectors to 70 $\mu$ m particles at 1mm pipe

次に icoUncoupledKinematicParcelFoam による仮想粒子の追跡について粒子位置ごとに入り口部からの角度分回転させることにより入り口の平面に管内相対粒子位置をまとめたものについて示す．生単離細胞仮想粒子と生細胞塊仮想粒子についてディーン数 20, 40 のものを Fig.4-3-22, ディーン数 60 のものを Fig.4-3-23 に示す．Fig.4-3-22,23 において曲り管内の粒子はディーン流れに乗るか沈降するかのどちらかの挙動を示していること，ディーン流れによって粒子が持ち上げられる高さが，ディーン数が大きくなるにつれて高くなっていることを示した．次にこれらの粒子追跡結果において粒子が沈降した割合について考察したものを Table4-4 に示す．この沈降粒子数には高さ 0 に配置された粒子を数えず，43 個の粒子について計測したものである．Table4-4 においてどちらの仮想粒子に関してもディーン数が大きくなるにつれて沈殿する粒子数が減少し，ディーン数 60 の条件において生単離細胞仮想粒子では沈殿率 0，生細胞塊仮想粒子では沈殿率 12%と低値を示している．今回の追跡粒子は研濁液中に分散した状態で解析を行っているが，本来の実験においては曲り管以前の直管部において粒子が界面上に沈殿する可能性もあるため，より高効率な粒子の分離を見込むことが出来る．

Table4- 2 Finish position of particle tracking at 6mm pipe

	30 $\mu$ m			70 $\mu$ m		
	De20	De40	De60	De20	De40	De60
Upper	38	41	43	10	26	38
Lower	5	2	0	33	17	5
sediment ratio [-]	0.12	0.05	0.00	0.77	0.40	0.12



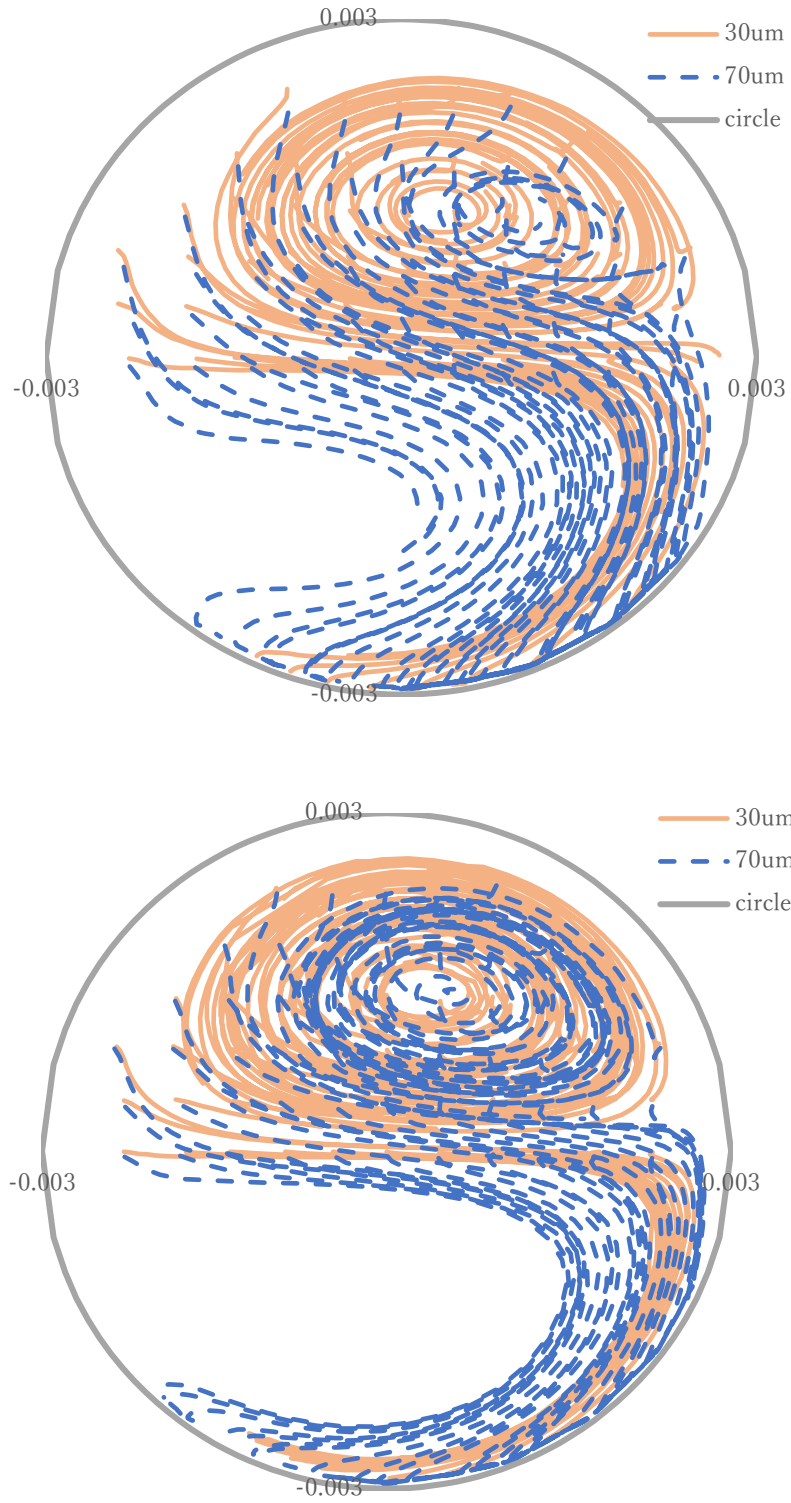


Fig.4-3- 22 Particle trace by CFD at 6mm pipe (De=20,40)

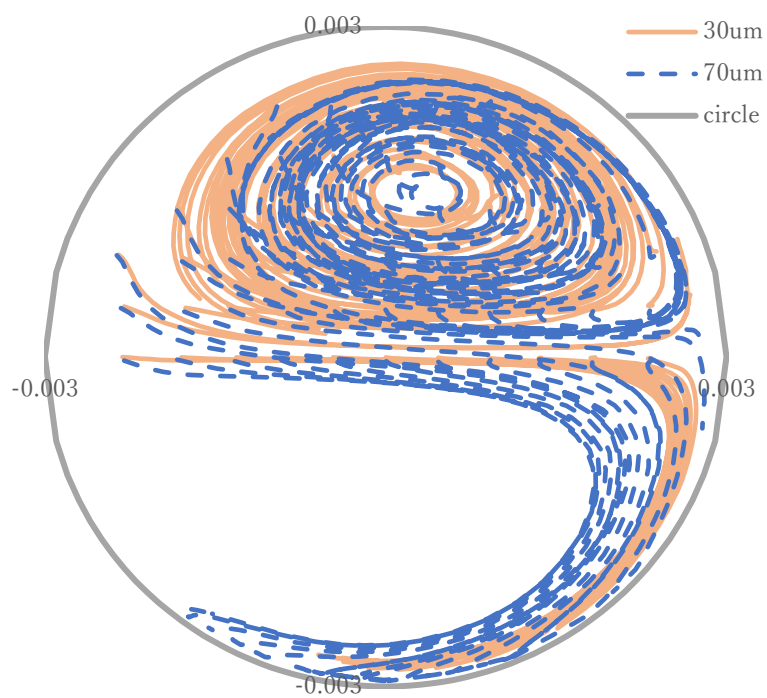


Fig.4-3- 23 Particle trace by CFD at 6mm pipe (De=60)

これまでの数値流体解析は単相におけるものであり、界面の存在を考慮していないが、本来の実験である液液二層流においては液液界面が存在しこの存在により流体の速度の変化や粒子追跡の結果が変化する可能性が存在する．本研究においては計算の簡易化のため、文献から引用した液液界面形状を有する半円管にて解析を行った．これらの半円管を用いて観察された断面流速について管中央部における外側へ向かう最大流速の比較について Fig.4-3-24 に、管外壁部による上向き流速の比較について Fig.4-3-25 に示す．Fig.4-3-24 より中央での外側へ向かうディーン流れの大きさは界面が曲率を有するほど高い値を示すことがわかる．これは界面にぶつかった流体が界面上をすべることにより、界面上部で流体が速くなることによると考察できる．一方 Fig.4-3-25 における曲率を有する場合の外側壁面近傍の上向き流速は水平な界面を有する場合の半分程度の値を示していることが確認できる．これは界面上部及び管内外側付近において界面から流体がはく離し、外側かつ界面近傍の位置によどみが出来てしまっていることに依存していると考えられる．界面の存在により上側ディーン流れの流線の大きさも小さくなることから、単相時の解析と比較して、より沈殿しやすいような環境であると考えられる．このような流れ場を有する曲り半円管における仮想粒子追跡の結果について、界面が水平なものを Fig.4-3-26、実験値と近いと考えられるエトベス数が 10 の場合の界面を有するものを Fig.4-3-27、さらに曲率の大きいエトベス数 1 の場合の界面を有するものについて Fig.4-3-28 に示す．Fig.4-3-26,27,28 についてどの条件においてもディーン数が大きくなるにつれてディーン流れに追従する粒子数が増えるなど、近い結果を有しているが、曲率のある界面を有する場合において界面と粒子が接触した際に、界面がない場合であれば、ディーン流れに追従する高さを通過する粒子であっても界面に捕捉されて管外側界面近傍に偏在することが確認できた．また本解析において界面と粒子の衝突モデルについて検討を行っていないため、解析によって界面上を移動する粒子の挙動について正確であるとはいえない．この検討により臨界ディーン数よりも低いディーン数において粒子が外側に偏在しない現象について解明するこ

とが可能であると考えられる.

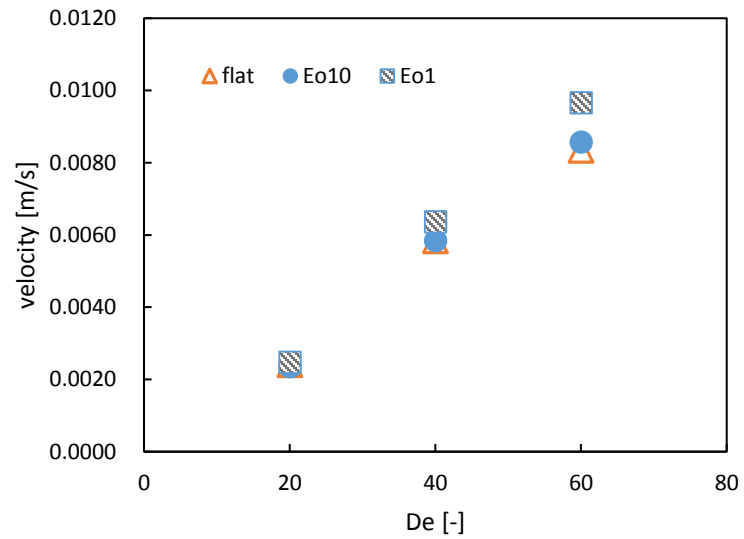


Fig.4-3- 24 Comparison max Dean velocity half pipe and having curvature interface pipe

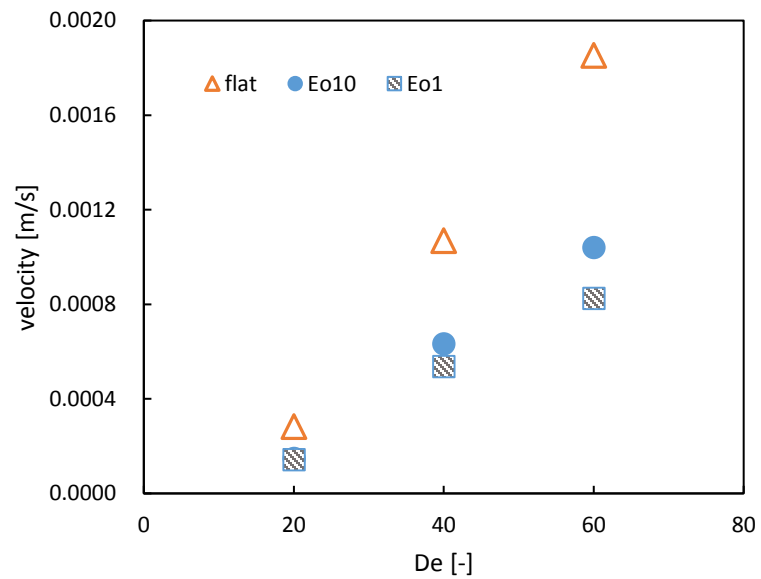


Fig.4-3- 25 Comparison upper Dean velocity half pipe and having curvature interface pipe

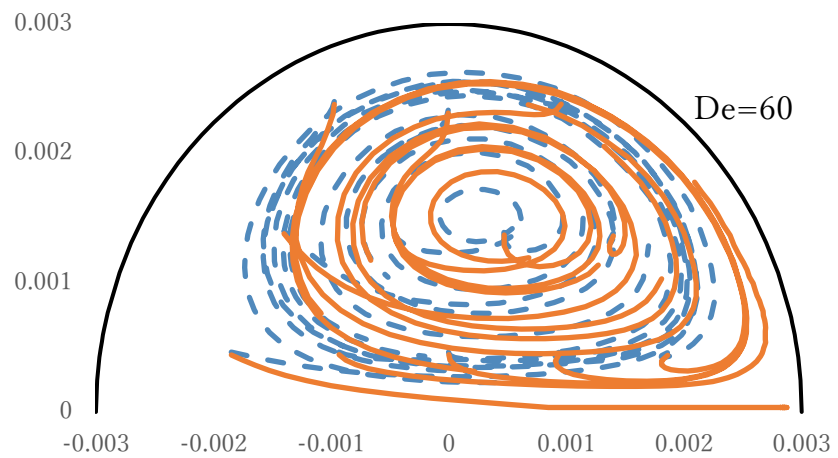
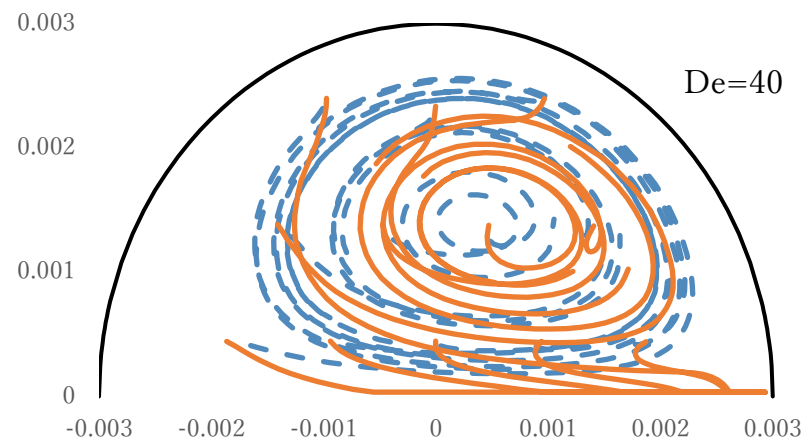
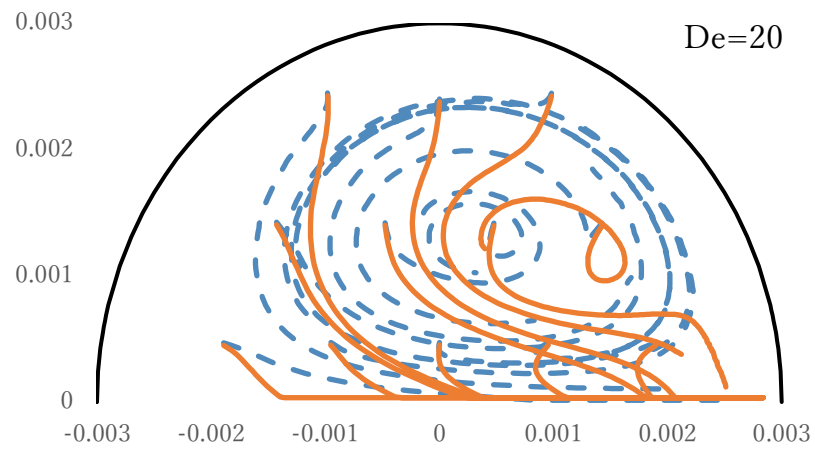


Fig.4-3- 26 Particle trace in 6mm half pipe

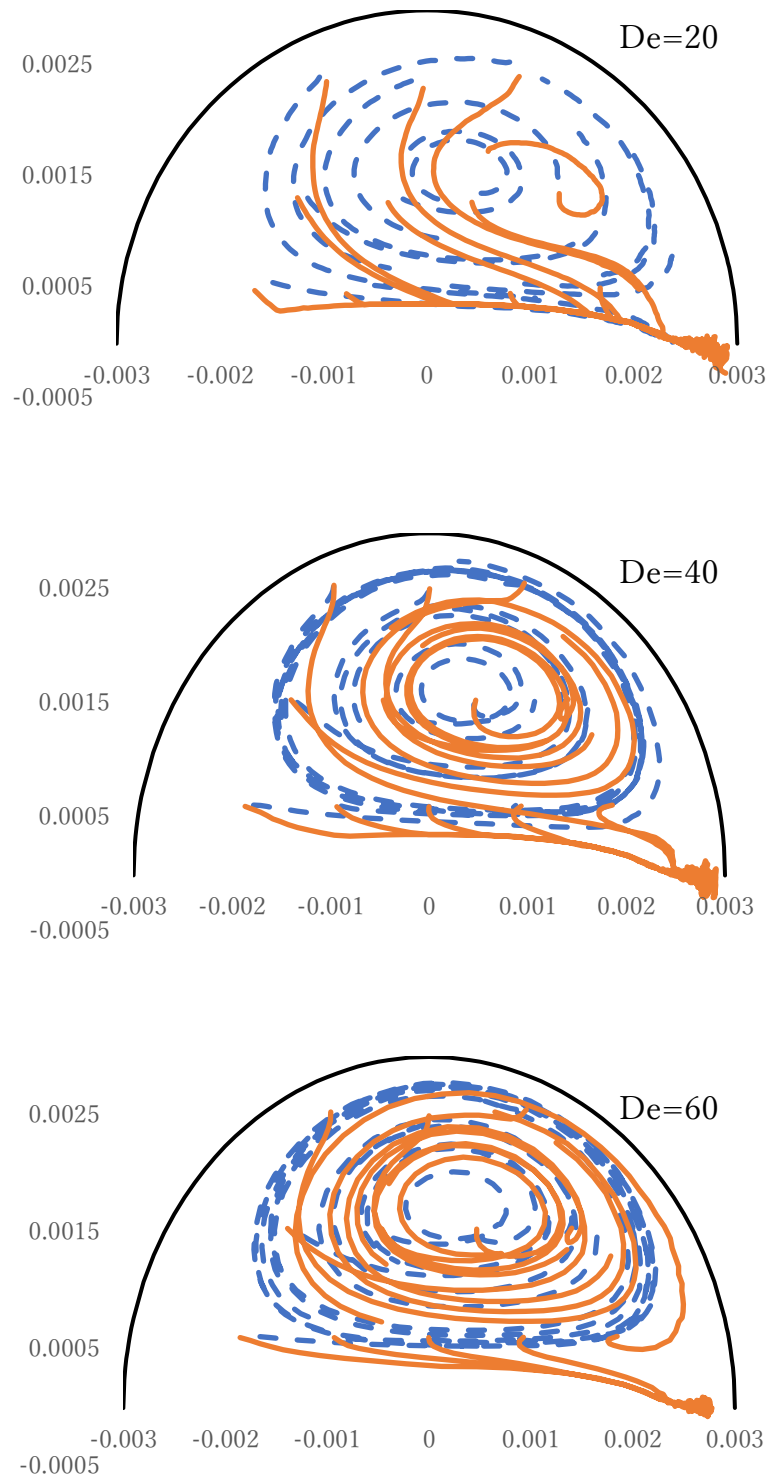


Fig.4-3- 27 Particle trace in 6mm pipe having curvature interface ( $E_o=10$ )

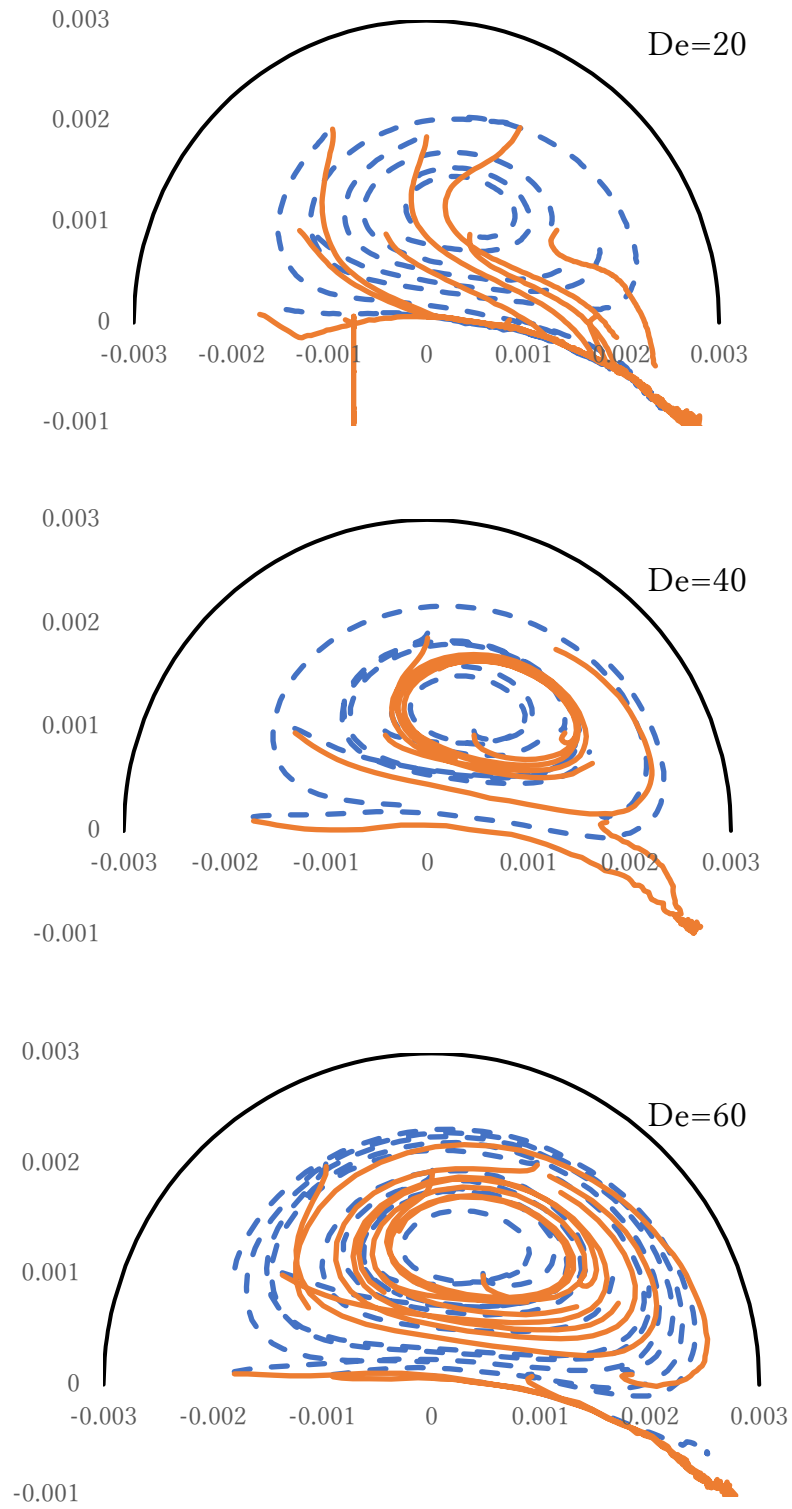


Fig.4-3- 28 Particle trace in 6mm pipe having curvature interface (Eo=1)

次に 1mm 管におけるディーン数 40 のときの生細胞塊仮想粒子と生単離細胞仮想粒子の粒子追跡結果について Fig.4-3-29, Fig.4-3-30 に示す. Fig.4-3-29 より粒径の大きい生細胞塊仮想粒子は管壁面に近づきながらディーン流れによる流体抗力の方  
向への動きが観察でき, Fig.4-3-30 において粒径の小さい生単離細胞仮想粒子は管内の上側渦を移動する様子が観察できる. この様に同位置に配置した粒子においても異なる挙動が見られ, これは前節により示した粒子に働く力の中の揚力が生細胞塊仮想粒子に働くことで外側へと移動していると考えられる.

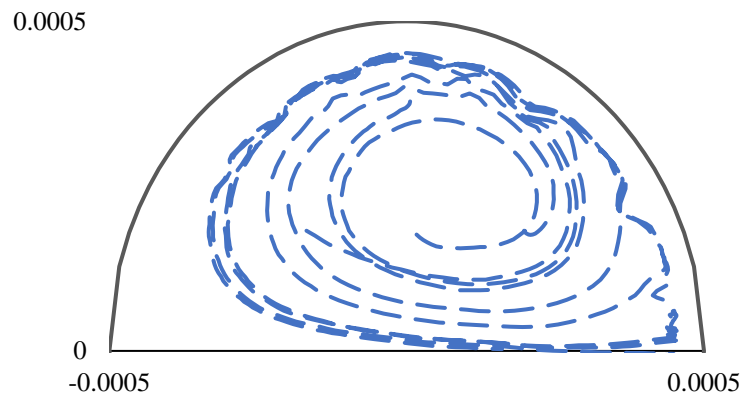


Fig.4-3- 29 70 $\mu$ m particle trace at 1mm pipe

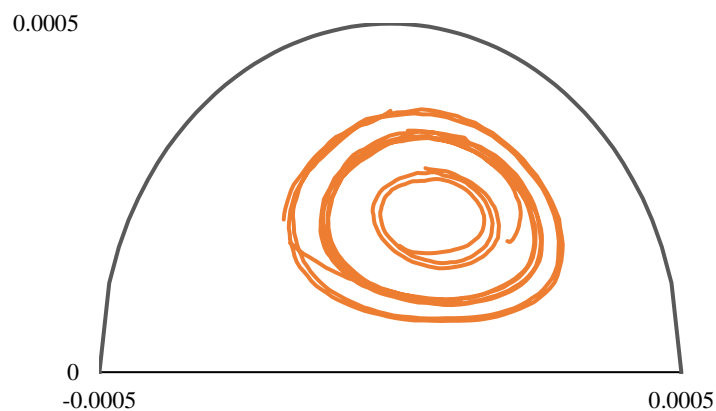


Fig.4-3- 30 30 $\mu$ m particle trace at 1mm pipe



#### 4.3.5 ディーン流れ流速と粒子に加わる力の検討

管内径が異なる曲り管を用いた細胞模擬粒子選別評価において、それぞれのディーン数においてディーン流れの断面流速について検討を行うことが必要であり重要である。従来のマイクロスケールであるディーン流れを用いた細胞選別法においてディーン流れ流速は大川原ら<sup>[37]</sup>による数値計算結果である次に示す式が多く用いられている。

$$\begin{aligned} v_{ave,Dean} &= 1.8 \times 10^{-4} De^{1.63} \\ v_{max,Dean} &= 3.9 \times 10^{-4} De^{1.63} \end{aligned} \quad \cdots (4.2)$$

しかしながら自身の実験スケールでは本二次流れ速度は見積もりよりもとても大きい値であり、正しく理論的に見積もる方法が必要である。そこで Yao ら<sup>[38]</sup>により計算されたディーン流れ断面流速スケールを示す以下の式を参考し、解析による結果との比較を行った。

$$v_{max,Dean} = U_{mean} \sqrt{\frac{d}{2R}} \quad \cdots (4.3)$$

これら二つの理論式により見積もられる断面におけるディーン流れ最大流速と本研究における数値流体解析によって算出した断面流速の最大値について示したものを Fig.4-3-31, Fig.4-3-32 に示す。Fig.4-3-31 はディーン数を変化させた際の管内径 $d=4\text{mm}$ の結果であり、Fig.4-3-32 はディーン数 40 において管内径を変化させた際の結果である。Fig.4-3-31 より式(4.2)、式(4.3)のどちらもディーン数が増加した際に流速も増加していることがわかる。定量的には式(4.2)を用いた流速が解析結果よりもオーダー一つ程度大きい値を示しているのに対し、式(4.3)による流速は比較的解析値と近い値を有している。Fig.4-3-32 において式(4.2)による最大流速は管内径が変化しても一定の値を示すことに対し、式(4.3)による最大流速は解析と同様の傾向を有していることを示した。これらのことから本研究スケールにおいてディ

ーン流速として式(4.3)を参考し、より詳細に最大流速を見積もるため補正係数である  $k$  を乗じた次式によりディーン流れ最大流速の見積もりを行う。

$$v_{max,Dean} = kU_{mean} \sqrt{\frac{d}{2R}} \dots (4.4)$$

この式(4-3-3)について無次元数であるディーン数  $De$  を用いて次式であらわす。

$$v_{max,Dean} = \frac{k v_f}{d} \times De \dots (4.5)$$

この式(4.5)を用いて管内径  $d=1, 4, 6\text{mm}$  におけるディーン数 20, 40, 60 のディーン流れ最大流速と解析による値について最小二乗法を用いて補正定数  $k$  を推定し、これにより補正された最大流速と解析値を比較したものを Fig.4-3-33 に示す。このとき用いた補正係数は  $k=0.73$  である。Fig.4-3-33 より管内径が異なる場合にディーン流れの大きさは異なること、式(4.5)による二次流れ流速見積もりが可能であることを示した。これを用いて選別理論の最適化を検討する。

選別理論において示したディーン流れによる上向き流体抗力の見積もりのために上向きの流速のディーン流れ最大流速に対する割合である定数  $c$  を用いて上向きディーン流れ流速を次式で示す。

$$v_{upper,Dean} = \frac{k' v}{d} \times De \quad (k' = ck) \dots (4.6)$$

選別理論において上向き流体抗力よりも粒子への重力が大きいもしくはつりあう場合に粒子が外側偏在すること、つりあう場合のディーン数を臨界ディーン数と定義することを示したが、式(4.6)とストークスの式を用いることにより臨界ディーン数を次式で表すことができる。

$$De_c = \frac{d}{k' v_f} \cdot \frac{d_p^2 (\rho_p - \rho_f)}{18 \mu_f} g \dots (4.7)$$

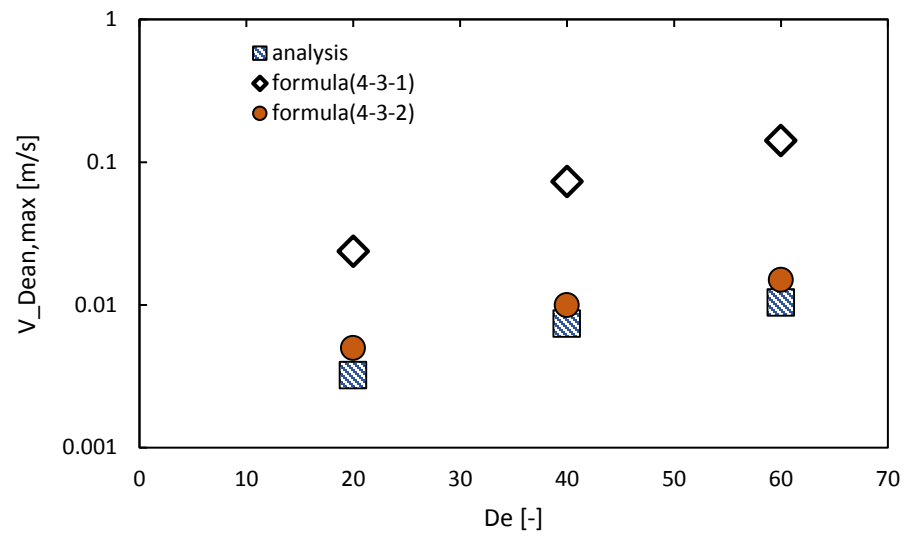


Fig.4-3- 31 Comparison  $V_{Deal,max}$  analysis and calculated value when changing Dean number

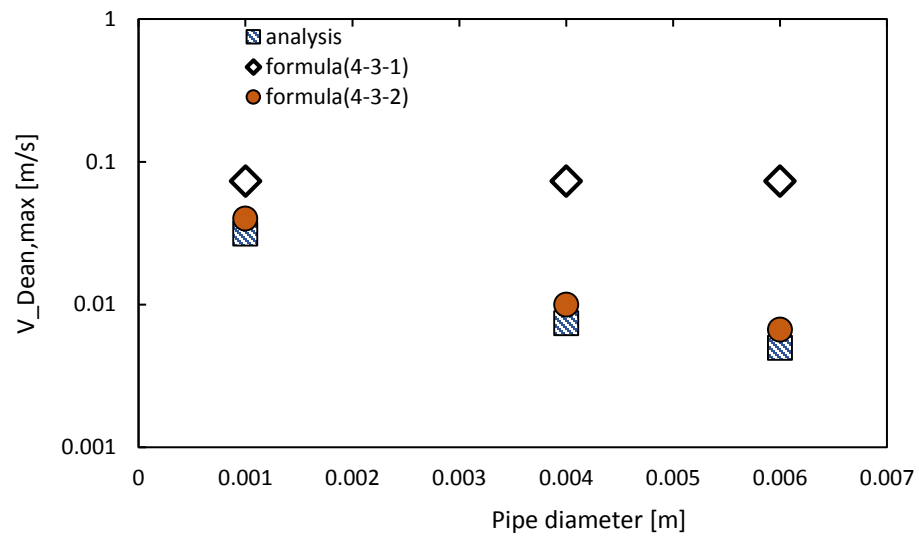


Fig.4-3- 32 Comparison  $V_{Deal,max}$  analysis and calculated value when changing pipe diameter

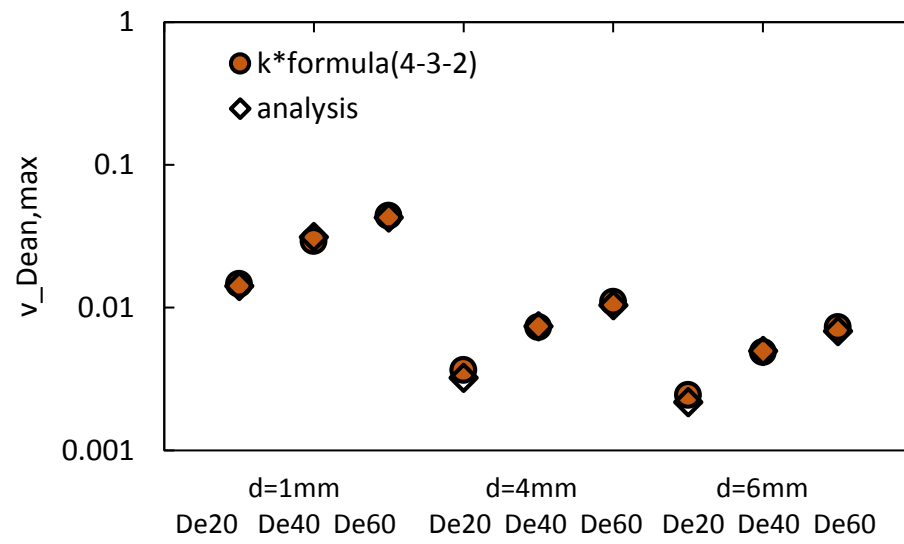


Fig.4-3- 33 Comparison  $V_{Deal,max}$  analysis and calculated value after correction

次に数値解析において実験の条件を模擬した曲率を有した半円管での二次流れ速度の見積もりを検討する．実験において流体抗力と重力による選別を可能にする臨界ディーン数を有した条件である管内径 4mm, 6mm の半円管 (エトベス数  $Eo=10$ ) において, Fig.4-3-34 に示すような半円管の底面部中心の高さを基準に, ある高さ  $h$  の二次流れ上向き速度の最大値について検討を行った．観察領域は  $\theta = 90^\circ$  である．任意の高さ  $h$  を管内径で除した無次元高さ  $h'$  における最大上向き二次流れ速度の大きさについて Fig.4-3-35 に示す．Fig.4-3-35 より曲り管内における断面上向き流速はディーン数によって傾向が異なり, ディーン数 60 のように無次元高さの増加と共に流速も増加する場合や, ディーン数 20 のように無次元高さが増加しても一定の高さを超えた条件については流速が増加しない傾向が見られた．これは断面上向き流速の最大値が低ディーン数時には無次元高さ 0.2 程度の位置に存在することに依存する．これらの流速について式(4.3)で除した値すなわち定数  $k'$  と無次元高さ  $h'$  の関係を Fig.3-4-35 に示す．Fig.3-4-35 において無次元高さ 0.2 以上の高い位置のディーン数 60 など極端に流速が早くなる条件を除いて, 管内径が異なっている場合においても無次元高さが同じ位置での補正定数  $k'$  が近い数値を示していることから, 低い高さにおける断面上向き流速は, 管内径に関わらず最大二次流れ速度  $v_{Dean,max}$  と高さに依存する  $k'$  により示すことが出来る．また今回実験において粒子分布を観察した界面近傍について着目すると, 無次元高さ  $h' = 0.025$  において補正定数  $k' = 0.25 \sim 0.5$ , 無次元高さ  $h' = 0.05$  において補正定数  $k' = 0.5 \sim 0.75$  程度となっていることを示した．

本研究中の細胞模擬粒子を用いた実験において得られた結果との比較を行う．式 (4.7)において実験条件と同様な臨界ディーン数を示す場合すなわち管内径 4mm における実験の生細胞塊模擬粒子において 100, 生単離細胞模擬粒子において 40 となる場合の補正係数  $k'$  を仮に見積もる．見積もり結果  $k' = 0.055$  の時に Table4-2 に示すような実験と同様の臨界ディーン数を示した．この補正定数は上記の無次元高さ

$0.025 \leq h' \leq 0.05$  の高さ内に存在する補正定数であることから，液液界面近傍であるこの無次元高さの範囲内において断面上向き方向流速による抗力と粒子に加わる重力による選別が行なわれる位置が存在すること，数値解析による断面上向き方向への流体速度の見積もりの妥当性を示した．また Table4-3 に界面近傍である無次元高さ $[0.025 \leq h' \leq 0.05]$ と管内径ごとの実高さ $h$ を示す．Table4-2 より 6mm 管における臨界ディーン数が 60 弱であること，生単離細胞の臨界ディーン数が実験条件外に存在することと実験と同様の結果を有していることが分かる．また Table.4-3 より管内径 4, 6mm では選別が行われる高さが実験に用いた粒子径よりも大きい，管内径が 1mm においては選別高さが細胞模擬粒子よりも低い位置もしくは同程度の位置に存在するため，流体抗力・重力における選別が出来ないことを示し，実験との整合性を示した．

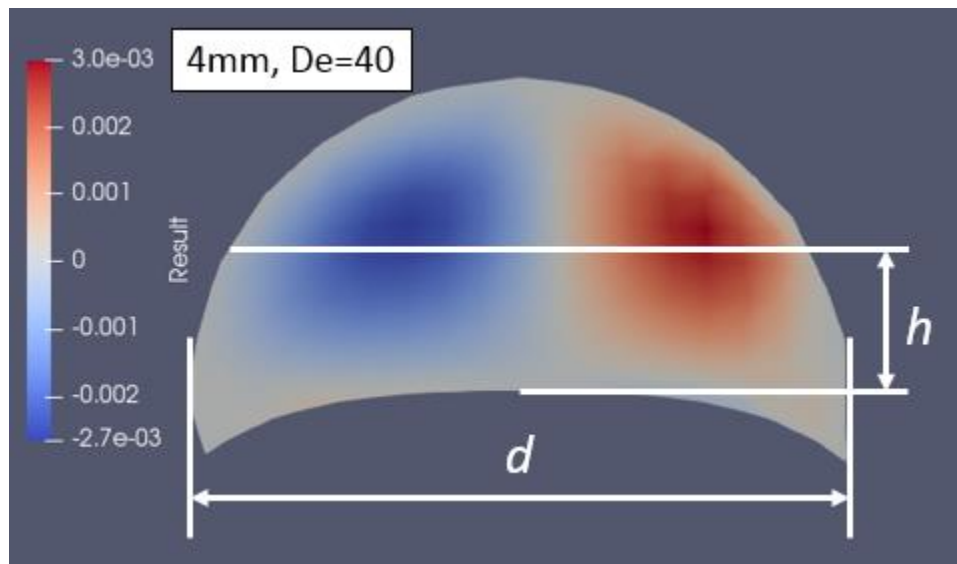


Fig.4-3- 34 Observation hight of upper direction Dean flow

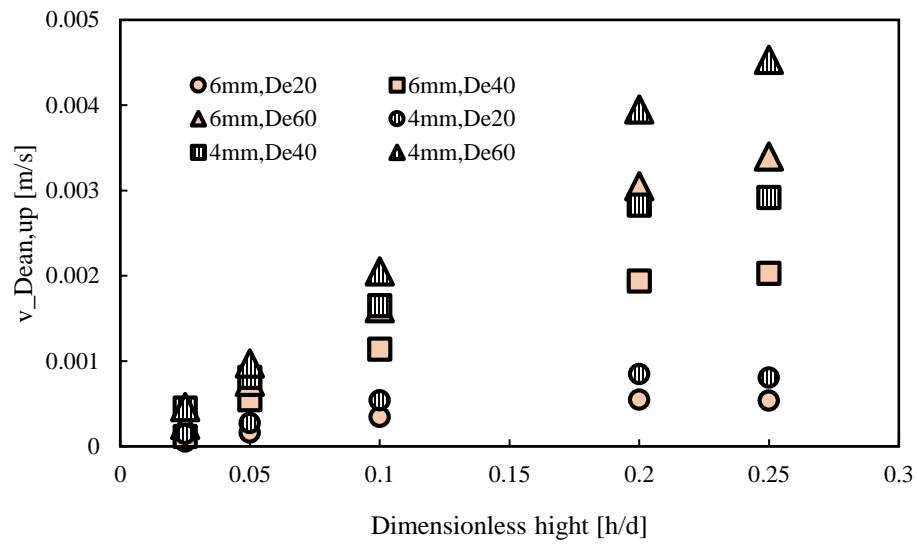


Fig.4-3- 35 Upper direction Dean velocity by observation height

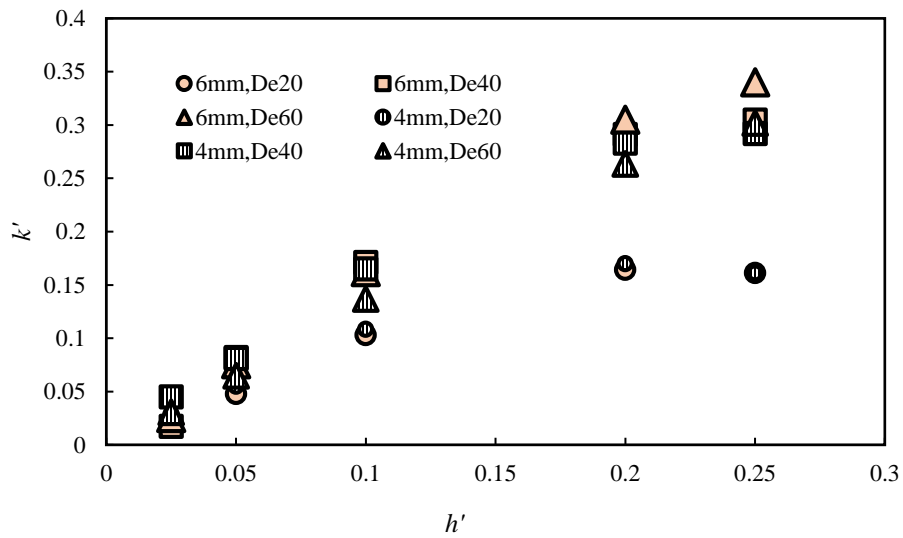


Fig.4-3- 36 Relationship of  $k'$  and  $h'$

Table4- 3 Calculated critical Dean number at  $k'=0.055$

	particle		
Pipe diameter	30 $\mu\text{m}$ , 1200kg/m <sup>3</sup>	70 $\mu\text{m}$ , 1200kg/m <sup>3</sup>	70 $\mu\text{m}$ , 1500kg/m <sup>3</sup>
1mm	2	10	24
4mm	7	39	97
6mm	11	58	146

Table4- 4 Hight of indicated Dean velocity when critical Dean number

	Hight in pipe $h$ [ $\mu\text{m}$ ]	
pipe diameter	$h'=0.025$	$h'=0.05$
1mm	25	50
4mm	100	200
6mm	150	300



#### 4.3.6 最適選別条件の検討

これまで密度差を有する粒子・粒径差を有する粒子についてのディーン流れによる流体抗力と重力による粒子選別方法（以下抗力・重力による粒子選別法）と管内主流速度分布による揚力と流体抗力の釣り合いにより粒子径の大きい粒子の管壁面近傍偏在を促す選別方法（以下揚力・抗力による粒子選別法）の2種類について示した．本節ではそれぞれの選別方法において高機能である生細胞塊模擬粒子の選別の最適条件をまとめ、今後どのような条件により細胞選別が可能であることを検討する．

抗力・重力による粒子選別について 6mm 管を用いた場合の粒子に加わる抗力・重力について比較する．生単離細胞と生細胞塊等の選別について密度  $1200\text{kg/m}^3$  の粒子径とディーン数ごとの抗力の大きさと重力の大きさについて Fig.4-3-37 に、また 2 力が釣り合う際のディーン数（臨界ディーン数）と粒子径の関係について Fig.4-3-38 に示す．Fig.4-3-37 より粒径  $30\mu\text{m}$  の粒子についてはディーン数 10 にて二力が釣り合い、 $70\mu\text{m}$  の粒子はディーン数 50 程度、 $110\mu\text{m}$  の粒子はディーン数 100 程度にて二力が釣り合うことが分かる．さらに Fig.4-3-38 において粒径が大きくなるほど臨界ディーン数も大きくなることから、細胞の径による選別が可能であることが分かる．また粒径  $70\mu\text{m}$  の細胞塊について生細胞と死細胞の選別について密度を  $1100, 1200\text{kg/m}^3$  での重力と抗力の大きさについて Fig.4-3-39 に、2 力が釣り合うディーン数と粒子密度の関係について Fig.4-3-40 に示す．Fig.4-3-39 より低密度粒子の場合は二力がディーン数 30 付近、高密度粒子はディーン数 50 付近で釣り合うことが分かる．また Fig.4-3-40 から臨界ディーン数は粒子密度と比例の関係であることが分かるため、密度についても選別可能であることを示した．これらのことからによる選別法では粒子径・密度共に選別が可能であることを示した．

一方揚力・抗力による粒子選別法について 1mm 管における条件における揚力と流体抗力について比較する．上記の条件と同様に粒子密度  $1200\text{kg/m}^3$  における粒子径変化時の二力の大小について Fig.4-3-41 に、また 2 力が釣り合うディーン数と粒

子径の関係を Fig.4-3-42 に示す. Fig.4-3-41 において粒径が  $30\mu\text{m}$  の粒子では流体抗力が揚力よりも支配的であること, 粒径  $110\mu\text{m}$  の粒子については揚力が流体抗力よりも支配的, 粒径  $70\mu\text{m}$  の粒子では低ディーン数において揚力が支配的, 高ディーン数において二力が近い値になることが分かる. Fig.4-3-42 から粒子径が大きくなるにつれて 2 力がつりあうディーン数が小さくなることがわかる. この 2 力が粒子径により異なることから揚力・抗力による選別可能性を示した. しかしながら粒径が一定の条件下における粒子密度が変化した際の二力について示した Fig.4-3-43 において, 粒子密度が変化しても二力の大小は異ならなく, 粒子密度と 2 力つりあいのディーン数の関係を示した Fig.4-3-44 においても一定であることから, 本選別法では粒子密度による選別が不可能であることを示した.

これらのことから本研究目的である高機能細胞の選別に最適である抗力・重力による選別が可能かつ, より広い送液条件範囲での水平界面が形成可能な  $6\text{mm}$  管を用いること, かつ臨界ディーン数であるディーン数 55 程度の条件において二流体を送液することで目的の高機能細胞を安定的に選別可能であると考察した.

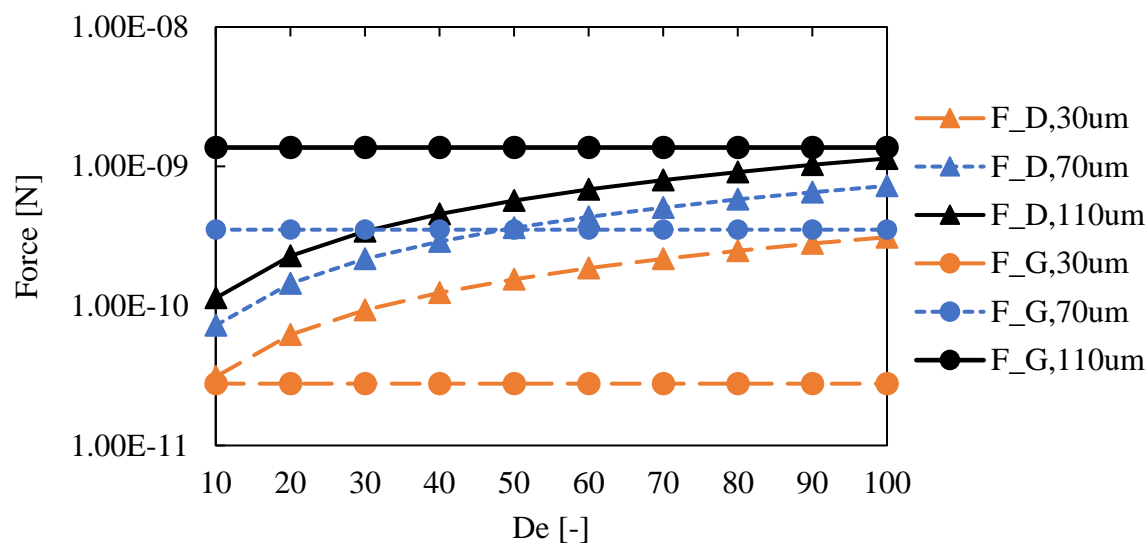


Fig.4-3- 37 Drag force and Gravity force for particle diameter classification

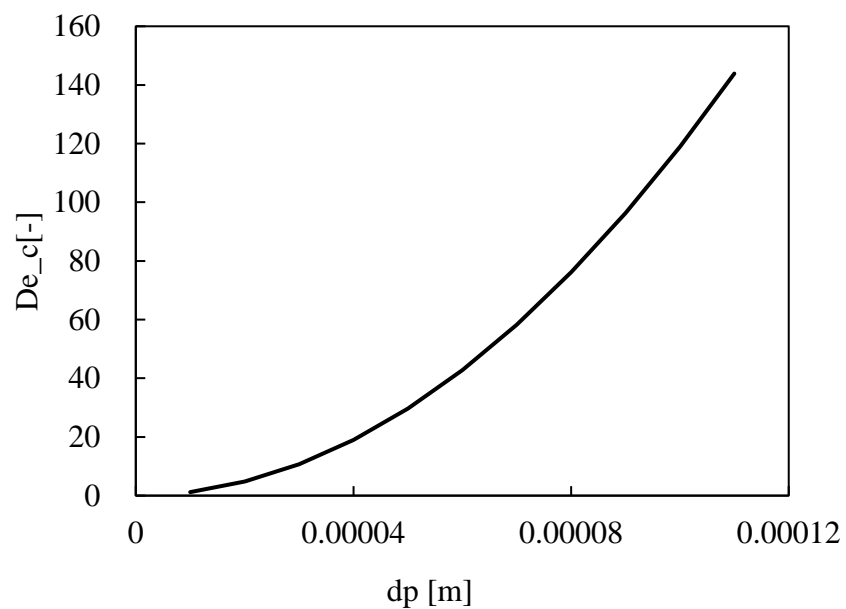


Fig.4-3- 38 Relationship of Dec and particle diameter

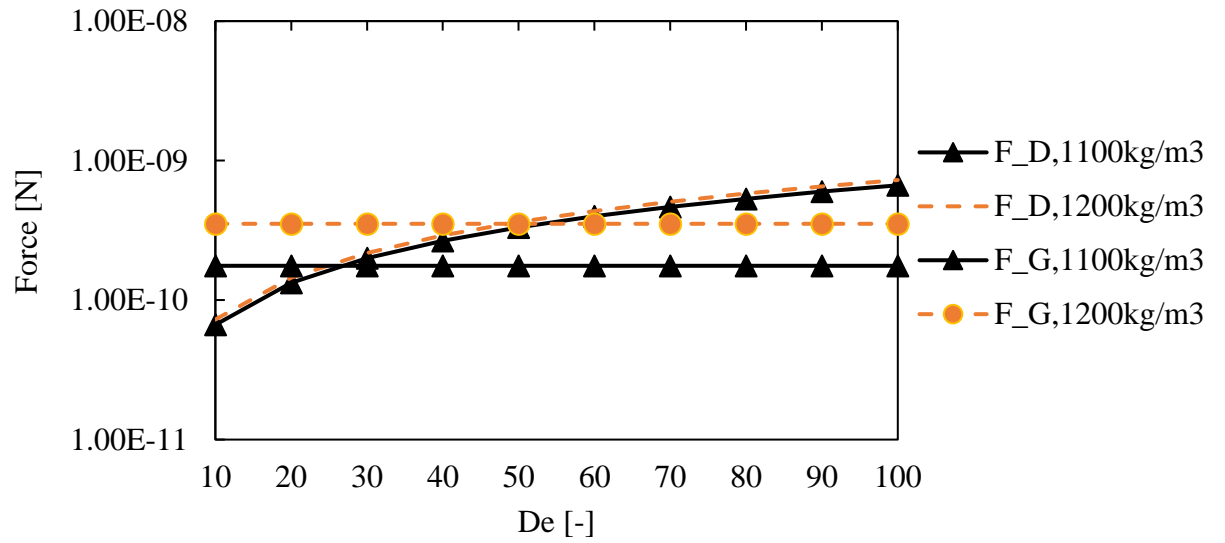


Fig.4-3- 39 Drag force and Gravity force for particle density classification

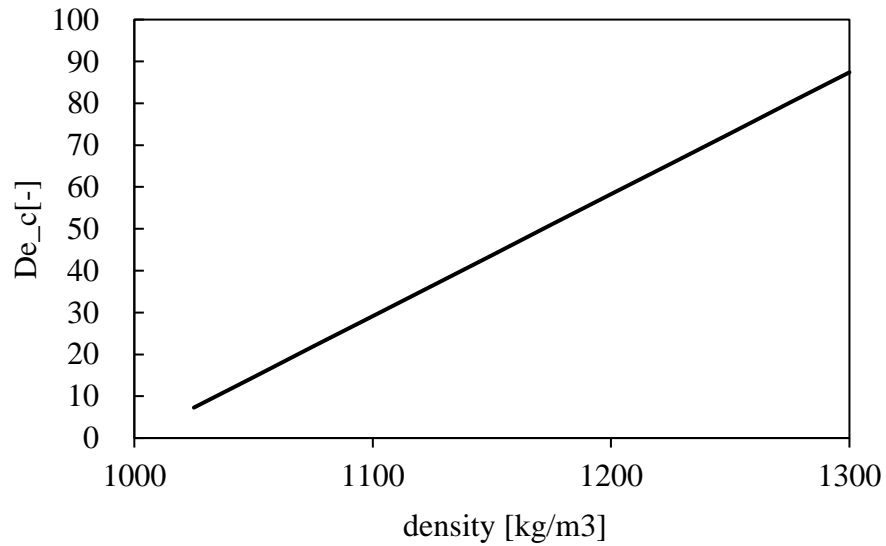


Fig.4-3- 40 Relationship of Dec and particle density

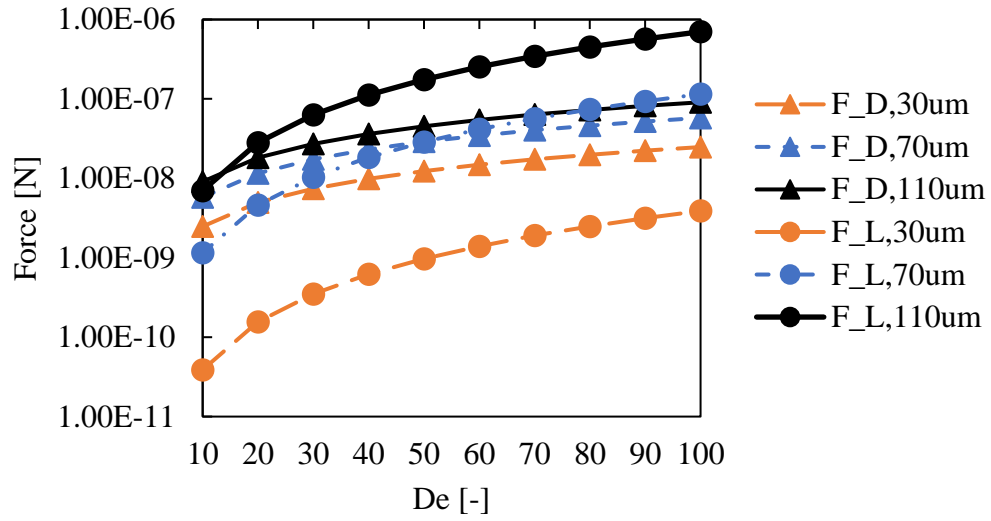


Fig.4-3- 41 Drag force and Lift force for particle diameter classification

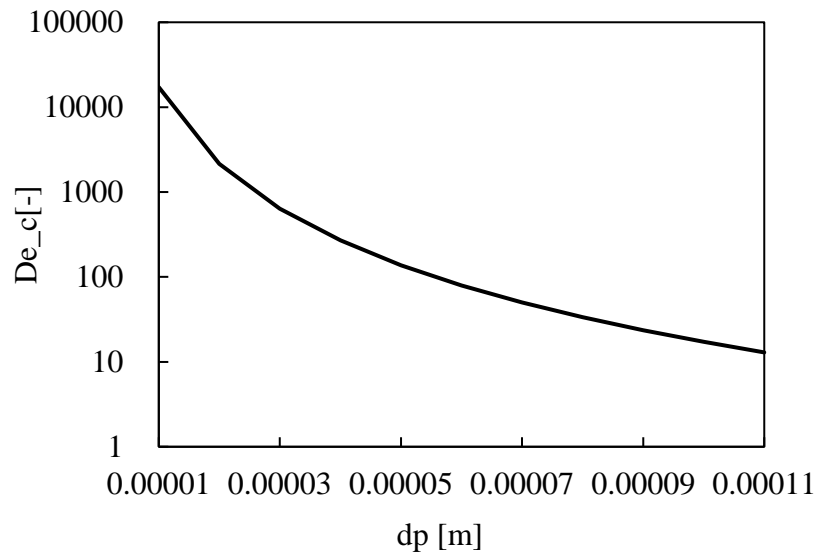


Fig.4-3- 42 Relationship of  $De_c$ , parallel and particle diameter

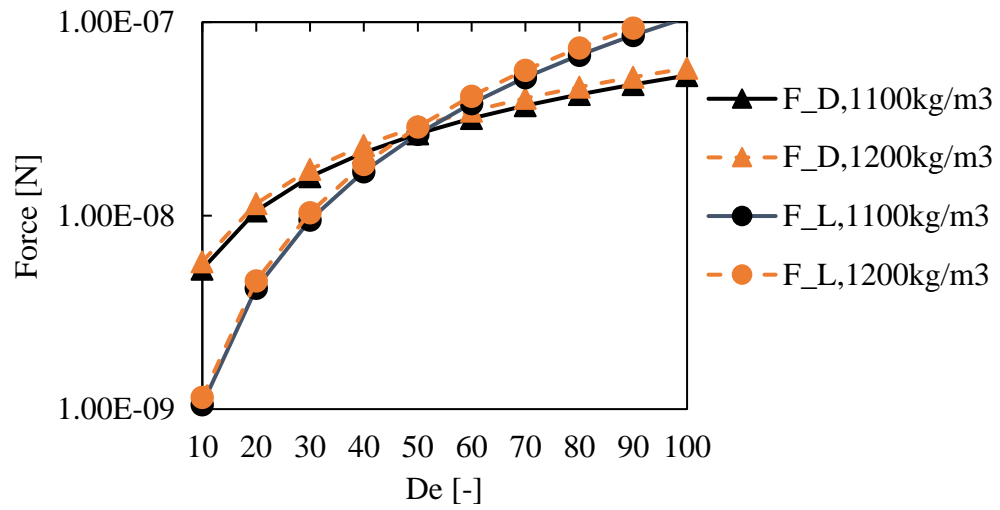


Fig.4-3- 43 Drag force and Lift force for particle density classification

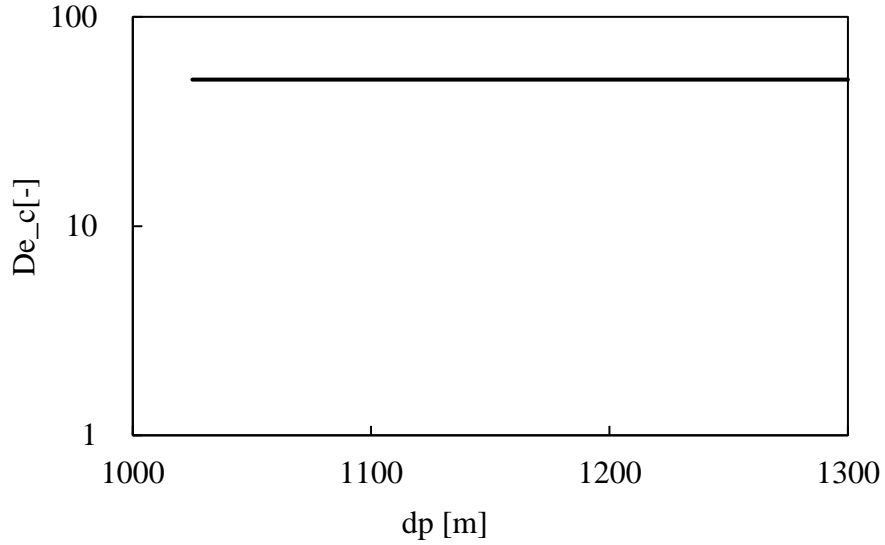


Fig.4-3- 44 Relationship of Dec,parallel and particle density

## 五章 結論

肝細胞移植に向けた細胞選別のための、直管・曲り管における液液界面形成実験および解析、密度差粒子及び粒径差粒子の選別実験、管内径変化による選別実験、数値流体解析により以下の結論を得た。

1. 管内水平液液二層流の形成条件は高密度流体のウェーバー数が 1 以上であり慣性力が界面張力より支配的であること、またキャピラリー数が一定の値より大きく粘性力が支配的であること、またエトベス数が一定の値より大きく、形成可能な液滴の径が管内径よりも小さいと予測されることであることを示した。
2. 曲り管管内液液二層流の形成条件として、慣性力による二層流形成条件は直管時と同様であること、重力による二層流形成条件は管の静置条件や水平条件の影響を大きく受けることを示した。
3. 密度差を有する細胞模擬粒子について、一方の臨界ディーン数条件での送液により細胞選別が可能であることを示した。
4. 粒径差を有する細胞模擬粒子について、管内径 6mm の管において上向き抗力と重力による選別の可能性、管内径 1mm の管における水平方向揚力と抗力による選別理論による細胞選別の可能性を示した。
5. 数値流体解析および計算により、流体抗力・粒子に加わる重力による選別理論の解明およびつりあい条件のディーン数である臨界ディーン数の理論式の提示、水平方向揚力と流体抗力による選別理論の解明および提案をした。
6. 各管内径における細胞を模擬した場合の粒子が受ける力のオーダー比較や影響の大きい 2 力がつりあう条件の提示により、6mm 管における上向き流体抗力・粒子に加わる重力での細胞選別において細胞塊選別・生細胞選別が可能であり、高機能細胞選別に最適であることを示した。



## 謝辞

本論文は首都大学東京大学院 理工学研究科 機械工学専攻における  
2017 年 4 月から 2019 年 2 月までの研究成果をまとめたものである。

本研究を進めるにあたり，首都大学東京大学院 理工学研究科 機械工学専攻  
小原弘道准教授，水沼博前教授には終始懇切丁寧な御指導及び御鞭撻を頂き，  
深く感謝いたしますと共に厚く御礼申し上げます。

御多忙な中，副査を担当していただき有益な御指導頂きました小方聡准教授，  
角田直人准教授，深く感謝いたします。

また本研究の遂行に当たり，器具や施設を使用させていただき，御協力，御助力  
いただきました，国立成育医療研究センター 絵野沢 伸先生に心より感謝いたし  
ます。

二年間の研究生生活の中で共に研究に励み，互いに議論し，多くの意見を頂いた  
伊庭洋貴学士，吉川遼学士，シュイシュン学士の皆様に深く感謝いたしますと共に，  
研究以外の日常生活においても有意義な時間を過ごす事が出来ました事を心から  
嬉しく思います。

## 参考文献

1. 坂井建雄 河原克雅, 人体の正常構造と機能, 日本医事新報社, pp.260-319
2. 日本肝移植研究会, 肝移植症状登録報告, 移植 Vol.51 No. 2・3, pp.146
3. 公益社団法人 日本臓器移植ネットワーク(社), 日本臓器移植ネットワーク 臓器移植に関する提供件数と移植件数, 2016 年
4. 崇徳豊嶋, 2016. 造血幹細胞移植の現状と展望. Mhc 23, 108-114.
5. 杉谷篤, 2011. 脾臓移植手術手技の進歩, 脾臓 26, 132-141.
6. 重田孝信 小児肝細胞移植の現況と展望 移植 Vol.50 No.6, 2015
7. Osypiw JC, Subpopulations of rat hepatocytes separated by Percoll density-gradient centrifugation show characteristics consistent with different acinar locations, Biochem. J. (1994) 304, pp.617-624
8. 重田孝信, 肝細胞移植の展望 ―新生児期発症の尿素サイクル異常への移植経験から― Organ Biology Vol.22 No.2, 2015
9. Enosawa, S., 2009. Hepatocyte isolation from human liver tissue Shin Enosawa. Organ Biol. 16, 361. Terry, C., Hughes, R.D., Mitry, R.R., Lehec, S.C., Dhawan, A., 2007.
10. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: Role of adhesion molecules. Cell Transplant. 16, 639-647. <https://doi.org/10.3727/000000007783465000>
11. 絵野沢伸 肝臓の細胞治療確立に必要な工学的アプローチ Organ Biology VOL.20 NO.2, 205-210.
12. Sufiandi, S., Obara, H., Hsu, H.C., Enosawa, S., Mizunuma, H., 2018. A linear shear model of cell viability loss during hepatocyte transplantation. J. Biomech. Sci. Eng. 13, 1-14. <https://doi.org/10.1299/jbse.17-00421>
13. 宮永恭, 肝細胞移植のための液液界面利用細胞塊分離法, 首都大学東京大学院修士論文, 2016

14. Yoshikazu kuroda, A NEW, SIMPLE METHOD FOR COLD STORAGE OF THE PANCREAS USING PERFLUOROCHEMICAL, TRANSPLANTATION Vol.46, No.3, pp.457-460
15. 松本 逸平, 膵臓・膵島移植における臓器保存法, 膵臓 Vol.26(2011), pp.142~152
16. Burns, J.R., Ramshaw, C., 1999. Development of a microreactor for chemical production. Chem. Eng. Res. Des. 77, 206–211.  
<https://doi.org/10.1205/026387699526106>
17. Gómez-Pastora, J., González-Fernández, C., Fallanza, M., Bringas, E., Ortiz, I., 2018. Flow patterns and mass transfer performance of miscible liquid-liquid flows in various microchannels: Numerical and experimental studies. Chem. Eng. J. 344, 487–497.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.110>
18. Morgan, R.G., Ibarra, R., Zadrazil, I., Matar, O.K., Hewitt, G.F., Markides, C.N., 2017. On the role of buoyancy-driven instabilities in horizontal liquid–liquid flow. Int. J. Multiph. Flow 89, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2016.07.009>
19. Ibarra, R., Zadrazil, I., Matar, O.K., Markides, C.N., 2018. Dynamics of liquid-liquid flows in horizontal pipes using simultaneous two-line planar laser-induced fluorescence and particle velocimetry. Int. J. Multiph. Flow 101, 47–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2017.12.018>
20. Fu, T., Wu, Y., Ma, Y., Li, H.Z., 2012. Droplet formation and breakup dynamics in microfluidic flow-focusing devices: From dripping to jetting. Chem. Eng. Sci. 84, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.08.039>
21. Thorsen, T., Roberts, R.W., Arnold, F.H., Quake, S.R., 2001. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. Phys. Rev. Lett. 86, 4163–4166.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.4163>
22. Huang, Z.Q., Wang, H., 2018. VOF simulation studies on single droplet fluid dynamic behavior in liquid-liquid flow process. J. Chem. Eng. Japan 51, 33–48.  
<https://doi.org/10.1252/jcej.17we120>
23. S, S.J., 2017. Flow-induced breakup of drops and bubbles.

24. Yao, C., Liu, Y., Xu, C., Zhao, S., Chen, G., 2018. Formation of liquid–liquid slug flow in a microfluidic T-junction: Effects of fluid properties and leakage flow. *AIChE J.* 64, 346–357. <https://doi.org/10.1002/aic.15889>
25. Wu, Z., Cao, Z., Sundén, B., 2017. Liquid-liquid flow patterns and slug hydrodynamics in square microchannels of cross-shaped junctions. *Chem. Eng. Sci.* 174, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.08.032>
26. Utada, A.S., Fernandez-nieves, A., Stone, H.A., Weitz, D.A., 2007. Dripping to Jetting Transitions in Coflowing Liquid Streams 094502, 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.094502>
27. Torkkeli, A., 2003. Droplet microfluidics on a planar surface. *VTT Publ.* 52, 3–194. <https://doi.org/10.1002/aic>
28. Fu, T., Wei, L., Zhu, C., Ma, Y., 2015. Flow patterns of liquid-liquid two-phase flow in non-Newtonian fluids in rectangular microchannels. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 91, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.03.020>
29. Yagodnitsyna, A.A., Kovalev, A. V., Bilsky, A. V., 2016. Flow patterns of immiscible liquid-liquid flow in a rectangular microchannel with T-junction. *Chem. Eng. J.* 303, 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.06.023>
30. Angeli, P., Hewitt, G.F., 2000. Flow structure in horizontal oil-water flow. *Int. J. Multiph. Flow* 26, 1117–1140. [https://doi.org/10.1016/S0301-9322\(99\)00081-6](https://doi.org/10.1016/S0301-9322(99)00081-6)
31. Nandagopal, M.S.G., Abraham, E., Selvaraju, N., 2017. Advanced neural network prediction and system identification of liquid-liquid flow patterns in circular microchannels with varying angle of confluence. *Chem. Eng. J.* 309, 850–865. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.106>
32. Davis, J.A., Inglis, D.W., Morton, K.J., Lawrence, D.A., Huang, L.R., Chou, S.Y., Sturm, J.C., Austin, R.H., 2006. 2006 Davis.Pdf 103, 14779–14784. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605967103>
33. 川村喜雄, 像走査法による細胞の分級技術に関する研究, 精密工学会誌 58/10/1992

34. Kosugi, M., Kashino, Y., Kudoh, S., Imura, S., 2012. Percoll 密度勾配を用いた遠心分離によるインクラゲの細胞外多糖（EPS）除去細胞の単離法 56, 285–293.
35. W.R.Dean, M.A, Fluid Motion in a Curved Channel.  
<https://doi.org/10.1098/rspa.1983.0054>
36. Kuntaegowdanahalli SS, Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels, Lab Chip. 2009 July 21;9 (20) pp.2973-80
37. Ookawara, S., Higashi, R., Street, D., Ogawa, K., 2004. Feasibility study on concentration of slurry and classification of contained particles by microchannel. Chem. Eng. J. 101, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2003.11.008>
38. Yao, L.S., 1983. Flow in curved pipes 88, 461–512.
39. I.D.Johnston, Dean flow focusing and separation of small microspheres within a narrow size range, Microfluid Nanofluid (2014) 17, pp.509–518
40. Martel, J.M., Toner, M., 2013. Particle Focusing in Curved Microfluidic Channels. Sci. Rep. 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep03340>
41. Kemna, E.W.M., Schoeman, R.M., Wolbers, F., Vermes, I., Weitz, D.A., Van Den Berg, A., 2012. High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel. Lab Chip 12, 2881–2887. <https://doi.org/10.1039/c2lc00013j>
42. Huang, Q., Mao, S., Khan, M., Zhou, L., Lin, J.M., 2018. Dean flow assisted cell ordering system for lipid profiling in single-cells using mass spectrometry. Chem. Commun. 54, 2595–2598. <https://doi.org/10.1039/c7cc09608a>
43. Warkiani, M.E., Khoo, B.L., Wu, L., Tay, A.K.P., Bhagat, A.A.S., Han, J., Lim, C.T., 2016. Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics. Nat. Protoc. 11, 134–48. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.003>
44. Hou, H.W., Warkiani, M.E., Khoo, B.L., Li, Z.R., Soo, R.A., Tan, D.S.W., Lim, W.T., Han, J., Bhagat, A.A.S., Lim, C.T., 2013. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. Sci. Rep. 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep01259>

45. Lee, W.C., Shi, H., Poon, Z., Nyan, L.M., Kaushik, T., Shivashankar, G. V., Chan, J.K.Y., Lim, C.T., Han, J., Van Vliet, K.J., 2014. Multivariate biophysical markers predictive of mesenchymal stromal cell multipotency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4409–E4418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402306111>
46. Seki, M., Science, Inertial Migration of Spherical Particles in Channel Flows 327-332.
47. Asmolov, E.S., 1999. The inertial lift on a spherical particle in a plane poiseuille flow at large channel Reynolds number. *J. Fluid Mech.* 381, 63–87.  
<https://doi.org/10.1017/S0022112098003474>
48. Suhas V. Patankar, 1980, Numerical Heat Transfer and Fluid Flow, Hemisphere Publishing Corporation.
49. Davanipour, M., Javanmardi, H., Goodarzi, N., 2018. Chaotic Self-Tuning PID Controller Based on Fuzzy Wavelet Neural Network Model. *Iran. J. Sci. Technol. - Trans. Electr. Eng.* 42, 357–366. <https://doi.org/10.1007/s40998-018-0069-1>
50. Mei, R., Klausner, J.F., 1994. Shear lift force on spherical bubbles. *Int. J. Heat Fluid Flow* 15, 62–65. [https://doi.org/10.1016/0142-727X\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0142-727X(94)90031-0)
51. Pg, S., The lift on a small sphere in a slow shear flow. *J. Fluid Mech.* 22, 1965. 385-400.
52. Courant, R., Friedrichs, K., Lewy, H., H, L., 1928. Über die partiellen Differenzengleichungen der. *Math. Ann.* 100, 32–74.  
<https://doi.org/10.1007/BF01448839>
53. Coilins, W. M. and Dennis, S. C. R. *Quart. J. pt'Iech.Appl. Math.*, VoL.28, Pt. 2 (1975-5), p. 133.
54. Soh, W. Y, and Berger, S. A., *J. Fluid Mech*, Vol. 148 (1984-11), p.109
55. Ng, T.S., Lawrence, C.J., Hewitt, G.F., 2001. Interface shapes for two-phase laminar stratified flow in a circular pipe. *Int. J. Multiph. Flow* 27, 1301–1311.  
[https://doi.org/10.1016/S0301-9322\(01\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0301-9322(01)00005-2)
56. Tomomasa Uemura, *Flow Visualization in Materials Processing: Practical Techniques and Selected Applications*, 199